



BACHELORARBEIT

Frau
Anna Grun

**Verwendung von „mCherry“ als
Reportersystem zur Bestimmung
der Stärke verschiedener
Promotoren**

Mittweida, 2016

BACHELORARBEIT

Verwendung von „mCherry“ als Reportersystem zur Bestimmung der Stärke verschiedener Promotoren

Autor:
Frau

Anna Grun

Studiengang:
Biotechnologie und Bioinformatik

Seminargruppe:
BI12w2-B

Erstprüfer:
Herr Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Herr M. Sc. Matthias Beck

Weitere Betreuer:
Frau Dr. Bettina Schiel-Bengelsdorf

Einreichung:
Mittweida, 11. Juli 2016

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2016

Bibliographische Beschreibung:

Grun, Anna: Verwendung von „mCherry“ als Reportersystem zur Bestimmung der Stärke verschiedener Promotoren. – 2016. – IX, 46 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2016

Englischer Titel

„Using "mCherry" as a reporter system for evaluation of the strength of serveral promoters“

Kurzbeschreibung:

In der folgenden Arbeit geht es um die Analyse der Stärke von verschiedenen Promotoren in den Mikroorganismen *Escherichia coli* und *Acetobacterium woodii*, welche mithilfe des rot fluoreszierenden Reporterproteins mCherry detektiert wurde. Die Messungen wurden jeweils bei zellsuspensionen mit dem TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd., Schweiz, durchgeführt. Die relative Fluoreszenz, bei der es sich um die gemessene Emission in Bezug auf die OD₆₀₀ der jeweiligen Zellsuspension handelt, spiegelt die Stärke des jeweiligen Promotors wieder.

Des Weiteren wurde die Klonierung des Promotors P_{bgal2} durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Acetogene Bakterien	1
1.2 Promotoren	2
1.3 Reportersysteme	3
2 Zielstellung	4
3 Material	5
3.1 Chemikalien, Geräte und „Kits“	5
3.1.1 Chemikalien	5
3.1.2 Molekulare Hilfsmittel („Kits“)	5
3.2 PCR-Ansätze	6
3.2.1 KAPA-Hifi-PCR	6
3.2.2 Kolonie-PCR	6
3.3 Pufferlösungen	6
3.4 Enzyme.....	7
3.5 Organismen, Plasmide, Oligonukleotide.....	7
3.6 Nährmedien	9
3.6.1 SOB-Medium	9
3.6.2 Nährmedium für <i>Escherichia coli</i>	10
3.6.3 Nährmedium für <i>Acetobacterium woodii</i>	10
3.7 Medienzusätze	10
3.8 Computerprogramme	11
4 Methoden.....	12
4.1 PCR	12
4.2 DNA-Gelelektrophorese.....	13
4.3 Klonierung eines Inserts in ein Plasmid mithilfe des „CloneJET™ PCR Kit“	14
4.3.1 Beimpfen einer Bakterienkultur	14
4.3.2 Plasmid-Präparation (Zyppy™ Plasmid Mini Prep)	14

4.3.3	Flüssigaufreinigung (NucleoSpin® ExtractII Kit) von DNA	15
4.3.4	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	15
4.3.5	Reinigung von DNA aus dem Agarosegel (NucleoSpin Gel + PCR cleanup Kit)	16
4.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	17
4.3.7	Ligation von DNA.....	17
4.3.8	Sequenzierung von DNA	18
4.4	Messung der relativen Fluoreszenz mithilfe des TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd.....	18
4.5	DNA-Transfer in Zellen	19
4.5.1	Herstellung kaltkompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	19
4.5.2	Transformation kaltkompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	19
4.5.3	Transformation in elektrokompente <i>Acetobacterium woodii</i> -Zellen	20
5	Ergebnisse	22
5.1	Klonierung des Promotors P_{bgaL2} aus <i>Clostridium perfringens</i> in das Plasmid pDSW1728.....	22
5.1.1	Amplifikation des Promotors aus dem Plasmid	22
5.1.2	Klonierung des Promotors in pDSW1728 über den Klonierungsvektor pJET1.2	23
5.2	Bestimmung der Aktivität verschiedener Promotoren in <i>E. coli</i>	27
5.2.1	Konstitutive Promotoren	30
5.2.2	Induzierbare Promotoren.....	32
5.3	Transformation verschiedener Plasmide in <i>A. woodii</i>	35
6	Diskussion	36
6.1	Klonierung des Promotors P_{bgaL2} aus <i>C. perfringens</i>	36
6.2	Bestimmung der Aktivität verschiedener Promotoren in <i>E. coli</i>	38
6.3	Transformation verschiedener Plasmide in <i>Acetobacterium woodii</i>	44
7	Ausblick.....	46
	Literaturverzeichnis.....	47
	Selbstständigkeitserklärung	50

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Schematische Darstellung des fertigen Plasmids pDSW1728_*P_{bgalL2}*. Der Promotor *P_{bgalL2}* ist blau dargestellt, und wird von den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NheI* und *SacI* flankiert. Des Weiteren sind die rot eingefärbten *Primer* FW_*PbgalL_NheI* und RV_*PbgL2_SacI* zu erkennen. Das Reportergen *mCherryOpt* ist gelb dargestellt.....22
- Abbildung 2 Bild der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Kontrolle der Klonierung des Promotors *P_{bgalL2}* in den Klonierungsvektor pJET Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1-5: Amplifikate der Kolonie-PCR der Klone 1-5, Positivkontrolle (+): Kolonie-PCR mit Plasmid pKOD-mazF als Matrize24
- Abbildung 3 Bild der Agarosegelelektrophorese des präparativen Verdaus mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI*. Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1: verdautes Plasmid pDSW1728_*tet* mit einer Größe von 7065 Bp; Spur 2: verdauter pJET-Vektor (Größe: 3000 Bp) mit dem ausgeschnittenen Promotor *P_{bgalL2}* (Größe: 1508 Bp).....25
- Abbildung 4 Agarosebild der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR nach der Transformation des Plasmides pDSW1728_*P_{bgalL2}* in kaltkompetente *E. coli* DH5 α -Zellen. Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1-12: Amplifikate der Kolonie-PCR der Klone 1-12, Positivkontrolle (+): *P_{bgalL}*, Negativkontrolle (-): PCR-Ansatz ohne Template-DNA.....26
- Abbildung 5 Gelelektrophoresebild des Kontrollverdaus der pDNA der Klone 4, 9 und 11. Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1-3: Amplifikate der Kolonie-PCR der Klone 4, 9 und 11, Positivkontrolle (+): pDSW1728_*P_{bgalL}*27
- Abbildung 6 Schematische Darstellung des Unterschieds zwischen den Promotoren *P_{bgalL}* und *P_{bgalL2}*.....28
- Abbildung 7 Schematische Darstellung der drei Varianten des *P_{pta-ack}*-Promotors von *C. ljungdahlii*29
- Abbildung 8 Relative Fluoreszenzen der Promotoren *P_{thlA}* und *P_{ptb}* und der Negativkontrolle pDSW1728_C1, welche zum Einen mit 400 ng/ml Anhydrotetracyclin und zum Anderen mit 20 mM Laktose induziert wurde. Alle Fluoreszenzen wurden bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.31

Abbildung 9	Relative Fluoreszenz der drei Varianten des $P_{pta-ack}$ -Promotors, gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.....	32
Abbildung 10	Relative Fluoreszenz des Promotors P_{tet} gemessen für verschiedene Induktormengen (Anhydrotetracyclin), gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.	33
Abbildung 11	Relative Fluoreszenz des Promotors P_{bgaL} gemessen für verschiedene Induktormengen, gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.	34
Abbildung 12	Relative Fluoreszenz des Promotors P_{bgaL2} gemessen für verschiedene Induktormengen, gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.	35
Abbildung 13	Vergleich der normierten Werte aller Promotoren, ggf. mit unterschiedlichen Induktormengen.	43
Abbildung 14	Pellets von je 4 ml <i>E. coli</i> DH5 α -Zellkultur. Die <i>E. coli</i> -Zellen enthalten folgende Plasmide (von links nach rechts): pDSW1728_ P_{thlA} , pDSW1728_ $P_{pta-ackL}$, pDSW1728_ P_{ptb} und pDSW1728_C1.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	50x TAE-Stammlösung (Sambrook & Russell, 2001).....	6
Tabelle 2	Verwendete Restriktionsenzyme	7
Tabelle 3	Verwendete <i>Primer</i>	7
Tabelle 4	Verwendete Plasmide	8
Tabelle 5	Verwendete Bakterienstämme.....	9
Tabelle 6	Verwendete Antibiotika	10
Tabelle 7	Verwendete Computerprogramme	11
Tabelle 8	PCR-Standardprogramm	13
Tabelle 9	Ansatz des präparativen Restriktionsverdaus.....	16
Tabelle 10	Ansatz des analytischen Restriktionsverdaus.....	16
Tabelle 11	Ligationsansatz.....	17
Tabelle 12	Ligationsansatz der pJET-Klonierung.....	17
Tabelle 13	Verwendete Plasmide mit entsprechenden Promotoren und ggf. Induktormengen im Fall induzierbarer Promotoren.....	30

Abkürzungsverzeichnis

®	„registered“ (eingetragenes Warenzeichen)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μ	Mirko- (10^{-6})
3D	Dreidimensional
<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i>
Abb.	Abbildung
ACK	Acetat-Kinase
ACS	Acetyl-CoA-Synthase
AG	Arbeitsgruppe
atc	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
<i>C. aceticum</i>	<i>Clostridium aceticum</i>
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. ljungdahlii</i>	<i>Clostridium ljungdahlii</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CO	Kohlenstoffmonooxid
Co.KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

CoA	Coenzym-A
CoFeS-P	Corronoid/Eisen-Schwefel-Protein
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5‘-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Kraft
f.	folgende
FD	Fast-Digest
ff.	die folgenden
FTTHFS	Formyl-THF-Synthetase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H ₂	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
Inc.	Incorporated Company
k	kilo
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
L	Liter

LB	Luria-Bertani
Ltd.	Limited
m	Meter
m	Milli- (10^{-3})
M	Marker = DNA-Ladder, der als Größenstandard bei der Agarose-Gelelektrophorese dient
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mod.	modifiziert
mol	Mol ($6,023 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
mRNA	„messenger RNA“, Boten-RNA
n	Nano- (10^{-9})
N	Stickstoff
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm
p	Piko- (10^{-12})
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PTA	Phosphotransacetylase
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
S.	Seite

TAE	Tris-Acetat-EDTA
THF	Tetrahydrofolat
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
™	„Trademark“
USA	„United States of America“, Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	„weight per volumen“, Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
Ω	Elektrischer Widerstand

1 Einleitung

1.1 Acetogene Bakterien

Unter den acetogenen Bakterien werden anaerobe Prokaryoten verstanden, welche durch die Nutzung des Wood-Ljungdahl-Wegs in der Lage sind Acetyl-CoA aus CO oder CO₂ zu synthetisieren. (Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012).

Erstmals wurde die Reduktion von CO₂ 1932 in Mikroorganismen aus Abwässern aufgezeichnet (Fischer *et al.*, 1932). Bei dem anaerob wachsenden Bakterium *Clostridium aceticum* handelt es sich um einen Gram-variablen, mesophilen Sporenbildner, der von Klaas Tammo Wieringa 1936 isoliert und beschrieben wurde (Braun *et al.*, 1981). Während des zweiten Weltkriegs ging das charakterisierte Bakterium jedoch verloren und wurde erst im Jahr 1981 zufällig von Gerhard Gottschalk entdeckt und reaktiviert (Adamse, 1980). Inzwischen wurden weit mehr als 100 acetogene Stämme aus Böden, Kot, Klärschlamm und dem Verdauungstrakt isoliert (Drake *et al.*, 2008), darunter auch das Gram-positive, anaerobe Bakterium *Acetobacterium woodii*, welches 1977 beschrieben wurde.

Neben der hohen Produktion von jährlich 10¹³ kg Essigsäure (Ragsdale, 2008), rücken die Acetogenen aufgrund der globalen Erwärmung und der damit verbundenen fossilen Kraftstoffversorgung immer mehr in den Fokus der Biotechnologie. Acetogene Bakterien, wie z. B. *Acetobacterium woodii*, sind in der Lage Kohlenstoff in Form von CO₂ zu reduzieren und als einziges organisches Stoffwechselprodukt Acetat zu bilden (Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012). Dies wird durch den für diese Prokaryoten charakteristischen Stoffwechselweg, dem Wood-Ljungdahl-Weg, ermöglicht. Man unterscheidet hier zwischen dem Methyl- und dem Carboxyl-Ast.

Der Carboxyl-Ast beschreibt die enzymatische Reduktion der CO₂-Moleküle zu CO durch die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (ACS). Im Methyl-Ast erfolgt die schrittweise Reduktion von CO₂ zu Acetyl-CoA. Hierbei wird zunächst CO₂ von einer Formiat-Dehydrogenase zu Formiat. Anschließend wird durch eine Formyl-THF-Synthetase (FTHFS) unter ATP-Verbrauch Tetrahydrofolat (THF) an das Formiat gebunden, sodass Formyl-THF entsteht. Über verschiedene THF-abhängige Enzyme erfolgt die Reduktion von Methyl-THF zu Formyl-THF. Die Methylgruppe wird auf ein Corronoid/Eisen-Schwefel-Protein (CoFeS-P) übertragen. Anschließend katalysiert der Enzymkomplex CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (ACS) die Bildung des Acetyl-CoAs aus dem Coenzym A, dem methylierten

CoFeS-P und dem CO des Carboxyl-Asts. Durch die Phosphotransacetylase (PTA) und die Acetat-Kinase (ACK) wird das Acetyl-CoA zu Acetat umgesetzt. (Bengelsdorf *et al.*, 2013).

Als Quelle für den eben beschriebenen Stoffwechselweg diene der Übersichtsartikel von Bengelsdorf *et al.* (2013). Dort kann die genaue Beschreibung des Wood-Ljungdahl-Wegs sowie eine detaillierte Abbildung nachgeschlagen werden.

1.2 Promotoren

Bei der Regulation der Genexpression spielen sogenannte Promotoren eine wichtige Rolle. Es handelt sich um Sequenzen, welche eine bestimmte Konsensussequenz aufweisen und sich stromaufwärts des Transkriptionsstarts befinden. Die *Pribnow Box* befindet sich 10 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts und wird aus diesem Grund auch -10-Box genannt. Die Konsensussequenz lautet TATAAT. Bei dem anderen Promotorelement handelt es sich um die -35-Box. Sie befindet sich 35 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts und die Basenabfolge der Konsensussequenz lautet hier TTGACA. (Brock *et al.*, 1970, S. 158)

Es wird zwischen konstitutiven und induzierbaren Promotoren unterschieden. Konstitutive Promotoren können nicht von äußeren Einflüssen beeinflusst werden und garantieren eine ständige Genexpression. Bei den induzierbaren Promotoren erfolgt eine Regulation durch Substrate, welche die Synthese der mRNA hemmen oder beschleunigen.

Wird die Synthese der mRNA gehemmt, sind sogenannte Repressoren an der Regulation beteiligt. Sie binden stromaufwärts des Transkriptionsstarts und somit vor der RNA-Polymerase, sodass diese nicht in der Lage ist den DNA-Strang abzulesen und in mRNA umzuschreiben. In manchen Fällen muss der Repressor erst noch durch einen Co-Repressor aktiviert werden. Diese Repression lässt sich durch den Einsatz von Induktoren aufheben. Induktoren binden über das Schlüssel-Schloss-Prinzip an den Repressor und verändern auf diese Weise die räumliche Struktur des Komplexes, sodass dieser nicht mehr an dem DNA-Strang binden kann und somit die RNA-Polymerase nicht weiter blockiert wird.

Nach einem ähnlichen Prinzip, nur mit einer verstärkenden Wirkung, funktioniert der Aktivator. Der Aktivator bindet im Regelfall stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Mittels einer Induktion wird der positive Effekt hierbei durch die Veränderung der 3D-Struktur noch erhöht. (Brock *et al.*, 1970, S. 170 ff.).

Induzierbare Promotoren sind ein nützliches Werkzeug in der Biotechnologie zur Kontrolle der Genexpression und finden hier vielseitige Verwendung.

1.3 Reportersysteme

Der Grundstein für die Anwendung von Reportersystemen wurde durch die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gelegt. Es handelt sich hierbei um ein Protein der Qualle *Aequorea victoria* und emittiert bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 397-475 nm, grünes Licht einer Wellenlänge von 508 nm (Shimomura *et al.*, 1962). Seit 1994 wurde das Reporter-gen insbesondere bei der Charakterisierung der Genexpression und bei der Proteinlokalisierung angewandt (Chalfie *et al.*, 1994).

Problematisch wird der Einsatz des GFP bei anaerob wachsenden Organismen, da für die korrekte Entfaltung des Proteins molekularer Sauerstoff benötigt wird (Tsien, 1998).

Aus diesem Grund wird bei anaerob wachsenden Bakterien oft auf andere Reporterproteine zurückgegriffen. Bei mCherry handelt es sich um ein rot fluoreszierendes Protein, welches sich besonders für anaerobe, Gram-positive Bakterien eignet. Das Gen des Proteins *mCherryOpt* wurde so optimiert, dass es bei einem niedrigen GC-Gehalt eine hohe Effektivität erzielt. (Ransom *et al.*, 2014). Das Reporterprotein mCherry wurde bei dem anaeroben Bakterium *Clostridium difficile* erfolgreich eingesetzt. (Ransom *et al.*, 2014)

2 Zielstellung

Diese Arbeit befasst sich mit der Prüfung der Stärke verschiedener Promotoren. Die Stärke der Promotoren soll mithilfe des rot fluoreszierenden Reporterproteins mCherry detektiert werden. Für die Messung der relativen Fluoreszenz wurde der TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd., Schweiz, verwendet. Zunächst würde die Stärke der Promotoren in *E. coli* DH5 α untersucht. Weiterhin ist es jedoch auch von Interesse, die Stärke der Promotoren in *A. woodii* zu bestimmen, weswegen die Promotor-tragenden Plasmide in *A. woodii* transformiert werden sollten.

Des Weiteren soll der *bgaL*-Promotor neu kloniert werden, da die Möglichkeit besteht seine Funktionalität auf diese Weise noch zu verstärken. Die Klonierung des neuen Promotors *P_{bgaL2}* soll unter Anwendung des „CloneJET™ PCR Kit“ durchgeführt werden.

3 Material

3.1 Chemikalien, Geräte und „Kits“

3.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Difco Laboratories, Augsburg
- GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
- Gibco BRL Life Technologies Inc., Eggenstein
- Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
- Merck KGaA, Darmstadt
- Otto Nordwald GmbH, Hamburg
- Riedel-de Haen AG, Seelze
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.2 Molekulare Hilfsmittel („Kits“)

In dieser Arbeit wurden verschiedene „Kits“ verwendet.

- Das „Nucleospin® Gel + PCR cleanup Kit“ wurde zur Reinigung aus einem Agarosegel genutzt.
- Die Isolation von Plasmiden wurde mit dem „Zyppy™ Plasmid Mini Prep Kit“ durchgeführt.
- Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Flüssigansatz wurde das „NucleoSpin® ExtracII Kit“ verwendet.
- Mithilfe des „CloneJET™ PCR Cloning Kit“ wurde die Klonierung eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid durchgeführt.

3.2 PCR-Ansätze

3.2.1 KAPA-Hifi-PCR

PCR-Ansatz:

Hifi-Puffer	5 μL
dNTPmix (10 mM)	0,75 μL
KAPA-Hifi-Polymerase	0,5 μL
Forward <i>Primer</i> (10 μM)	0,75 μL
Reverse <i>Primer</i> (10 μM)	0,75 μL
Template-DNA	0,2 μL
dd H ₂ O	ad 20 μL

3.2.2 Kolonie-PCR

PCR-Ansatz:

Puffer S	2 μL
dNTPmix (40 mM)	0,4 μL
Taq DNA-Polymerase (5 U/ μL)	0,1 μL
Forward <i>Primer</i> (10 μM)	0,4 μL
Reverse <i>Primer</i> (10 μM)	0,4 μL
Bakterienkolonie	
dd H ₂ O	ad 20 μL

3.3 Pufferlösungen

Tabelle 1 50x TAE-Stammlösung (Sambrook & Russell, 2001)

Chemikalie/Lösung	[M]	Menge
Tris/HCl	2 M	242,6 g
Eisessig	1 M	57,1 mL
EDTA	50 M	16,6 g
dd H ₂ O		ad 1000 mL

3.4 Enzyme

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit den folgenden Enzymen gearbeitet.

Tabelle 2 Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Funktion	Hersteller/Lieferant
FD <i>NheI</i>	Restriktionsenzym, Schneidet DNA an spezifischer Schnittstelle	Thermo Scientific Rockford, USA
FD <i>SacI</i>	Restriktionsenzym, Schneidet DNA an spezifischer Schnittstelle	Thermo Scientific Rockford, USA
T4-Ligase	Ligation einzelner DNA-Fragmente	Thermo Scientific Rockford, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amplifikation von DNA-Sequenzen durch PCR	Thermo Scientific Rockford, USA
KAPA-Hifi-Polymerase	Amplifikation von DNA-Sequenzen durch PCR	Thermo Scientific Rockford, USA

3.5 Organismen, Plasmide, Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide (im Weiteren als *Primer* bezeichnet) wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen und nach deren Angaben auf eine Konzentration von 100 pmol/μL mit dd H₂O angesetzt. In Tabelle 3 sind die Oligodesoxynukleotide aufgelistet, Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wurden dabei unterstrichen.

Tabelle 3 Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schnittstellen
FW_PbgaL_ <i>NheI</i>	<u>GCTAGC</u> GAGATGAAAAGTATTAGGGC TAATTTAG	<i>NheI</i>
RV_PbgaL2_ <i>SacI</i>	CTTTACAG <u>GAGCTC</u> TTATCCGCTCACAA TTCCAC	<i>SacI</i>
pJET1.2 Forward Sequencing Primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	
pJET1.2 Reverse Sequencing Primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Größe (Bp)	Referenz
pDSW1728	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> , Tetracyclin-induzierbarer Promotor	7913	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{bgaL}	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> , Laktose-induzierbarer Promotor von <i>C. perfringens</i>	8485	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{thlA}	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> , <i>thlA</i> -Promotor von <i>C. acetobutylicum</i>	7208	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{pta-ackL}	Cm ^R , <i>mCherryOp</i> , <i>pta</i> -	7235	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{pta-ackS1}	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> <i>pta-ack</i> -Promotor (1. kürzere Version) von <i>C. ljungdahlii</i>	7177	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{pta-ackS2}	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> , <i>pta-ack</i> -Promotor (2. kürzere Version) von <i>C. ljungdahlii</i>	7134	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{ptb}	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> , <i>ptb</i> -Promotor von <i>C. acetobutylicum</i>	7164	Beck, unveröffentlicht
pDSW1728_P _{bgaL2}	Cm ^R , <i>mCherryOpt</i> , Laktose-induzierbarer Promotor von <i>C. perfringens</i>	8577	diese Arbeit
pJIR750	Cm ^R	6568	Bannam & Rood (1993)

In der folgenden Tabelle 5 sind die verwendeten Bakterienstämme zu finden.

Tabelle 5 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA</i> 1 <i>glnV44 thi-1 recA</i> 1 <i>relA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZΔM15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U 169, <i>hsdR</i> 17(<i>rk-</i> <i>mK+</i>), λ-	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	Δ(<i>mrcA</i>)183 Δ(<i>mrcCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i>)173 <i>endA</i> 1 <i>supE44 thi-1 recA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1 <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>laqIqZΔM15 Tn10 (Tetr)</i>]	Stratagen GmbH; Braunschweig
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM1030	Typstamm	DSMZ, Braunschweig

3.6 Nährmedien

3.6.1 Nährmedium für *Acetobacterium woodii*

„1612 mod. 2.0“-Medium:

NH ₄ Cl	0,2	g
K ₂ HPO ₄	1,76	g
K ₂ HPO ₄	8,44	g
(SL-9) Minerallösung	2	mL
Vitaminlösung	2	mL
(Biegel/Schmiedt)		
Hefeextrakt	3	g
NaHCO ₃	10	g
Cystein-HCl	0,3	g
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,3	g
Resazurin	1	mL
dd H ₂ O	ad 1000	mL

Es erfolgt die Begasung des Mediums mit N₂/CO₂ (80 % / 20 %).

Anschließend wird das Medium 15 min autoklavieren.

Zugabe nach dem Autoklavieren:

MgSO ₄ x 7 H ₂ O (750 mM)	0,33	g
---	------	---

3.6.2 SOB-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid	0,5 g
dd H ₂ O	950 mL

Das Medium wird mit 5 N NaOH auf einen pH-Wert von 7 gebracht.

Anschließend wird das Medium autoklaviert.

Zugabe vor Gebrauch:

Kaliumchlorid (250 Mm)	10,0 mL
Magnesiumchlorid (2 M)	5 mL

3.6.3 Nährmedium für *Escherichia coli*

LB-Medium:

Trypton	10,0 g
Natriumchlorid	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
dd H ₂ O	ad 1000 mL

Zugabe, bei der Herstellung von Agarplatten:

Agar	15,0 g
------	--------

3.7 Medienzusätze

In der unten aufgeführten Tabelle 6 sind die verwendeten Medienzusätze zu finden.

Tabelle 6 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Chloramphenicol	30	Ethanol, 96% (v/v)	30
Ampicillin	100	dd H ₂ O	100
Thiamphenicol	20	Dimethylformamid	15

3.8 Computerprogramme

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit den in der Tabelle 7 genannten Computerprogrammen gearbeitet.

Tabelle 7 Verwendete Computerprogramme

Computerprogramm	Firma
CLC Main Workbench 7	CLC bio, Massachusetts, USA

4 Methoden

4.1 PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988), handelt es sich um eine der wichtigsten Methoden der Biotechnologie. Sie ermöglicht die gezielte Vervielfältigung von DNA-Fragmenten in kurzer Zeit. Für die Durchführung der PCR essentiell ist die DNA-Polymerase. In der Natur ist die Hauptaufgabe dieses Enzyms die Synthese der Erbinformation im Organismus.

Neben der Polymerase sind im Reaktionsansatz der PCR noch andere Substanzen zu finden. Bei den sogenannten *Primern* handelt es sich um kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die synthetisch hergestellt werden. Diese binden im *Annealing*-Schritt komplementär an die DNA und erzeugen somit ein 3'-Ende für die DNA-Polymerase, da diese nur vom 5'- zum 3'-Ende arbeiten kann. Die *Primer* werden so konstruiert, dass sie an die jeweiligen Enden des gewünschten Teils der DNA binden. Des Weiteren sind im PCR-Ansatz noch Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die einzelnen Bausteine der DNA, ein Puffer für das geeignete Milieu der DNA-Polymerase und die Template-DNA enthalten.

Der PCR-Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen. Den Anfang macht die Denaturierung. Bei einer Temperatur von 95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der doppelsträngigen DNA aufgebrochen, sodass zwei Einzelstränge entstehen. Beim nächsten Schritt, dem *Annealing*-Schritt, sinkt die Temperatur zwischen 55 – 72 °C ab. Hierbei muss die Länge der *Primer* berücksichtigt werden, da diese nun an die DNA-Einzelstränge hybridisieren sollen. Ist die Temperatur zu hoch, ist die Eigenbewegung der kurzen DNA-Fragmente zu stark, sodass gewünschte Wasserstoffbrückenbindungen wieder auseinandergerissen werden. Bei einer zu niedrigen Temperatur können die *Primer* unspezifisch binden, sodass ungenaue Produkte entstehen können. Aus diesen Gründen wird die *Annealing*-Temperatur so hoch wie möglich angesetzt, um ein möglichst spezifisches Produkt zu bekommen.

Der letzte Schritt des PCR-Zyklus ist die Elongation. Bei einer Temperatur von 72 °C arbeitet die Polymerase am effektivsten und kann an die 3'-Enden des *Primers* binden und den DNA-Einzelstrang wieder zu einem Doppelstrang vervollständigen. Aufgrund der vielen Wiederholungen wird das gewünschte DNA-Fragment gezielt vervielfältigt. In der folgenden Tabelle 8 ist ein typischer PCR-Zyklus aufgeführt, wobei die Schritte 2-4 je nach Art der PCR 26-34-mal wiederholt werden.

Tabelle 8 PCR-Standardprogramm

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5-10 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. <i>Annealing</i>	Variabel	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min / 1000 Bp
5. Finale Elongation	72 °C	5-10 min
6. Aufbewahrung	8 °C	unendlich

Es gibt verschiedene Arten von PCR, die sich durch die Wahl der Polymerase unterscheiden. Eine Standard-PCR, welche meist zur Kontrolle einer Klonierung genutzt wird, wird für gewöhnlich mit der *Taq*-DNA-Polymerase, welche aus dem Organismus *Thermus aquaticus* stammt, durchgeführt. Bei Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR werden hingegen Polymerasen verwendet, welche eine *proof-reading*-Funktion besitzen, damit das Amplifikat möglichst keine Mutationen aufweist. Die Robust-Polymerase und die Phusion-Polymerase zählen zu den eben genannten Enzymen.

4.2 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese (Green & Sambrook, 2012) dient dem Auftrennen von Nucleinsäuren und Polypeptiden, sowie deren Fragmenten. Hierbei werden die unterschiedlichen Größen, insbesondere aber die elektrischen Ladungen der Makromoleküle genutzt.

Zur Auftrennung von Nucleinsäuren werden die Proben in dafür vorgesehene Vertiefungen eines Agarosegels gegeben. Anhand der Konzentration des Gels kann die Porengröße beeinflusst werden, welche sich auf die Fließgeschwindigkeit der Makromoleküle auswirkt. Das Agarosegel, welches in einem ionischen Puffer liegt, wirkt dabei wie ein molekulares Sieb. Aufgrund des angelegten Gleichstroms wandern die DNA-Fragmente in Abhängigkeit der Molekülmasse und Ladungsanzahl durch das Agarosegel in Richtung der Anode. Die aufgetrennten Fragmente liegen dann als Bandenmuster im Gel vor, das mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wird. Es handelt sich dabei um eine DNA-interkalierende Substanz, welche die Makromoleküle unter UV-Licht sichtbar macht.

Zu jeder Probe werden noch, je nach Volumen, 1-3 µL Ladepuffer hinzugegeben. Diese hat mehrere Gründe. Zunächst einmal wird auf diese Weise der pH-Wert der Probe gepuffert und somit stabilisiert. Des Weiteren sind darin Moleküle mit einer höheren Dichte enthalten,

welche durch die Erhöhung der Probendichte dafür sorgen, dass diese in den jeweiligen Geltaschen einsinken. Außerdem befinden sich in dem Ladepuffer noch farbige, anionische Moleküle geringer Größe, welche die Lauffront sichtbar machen, sodass man den Fortschritt der Gelelektrophorese nachvollziehen kann.

Um die Laufweite der jeweiligen Banden vergleichen zu können, muss zusätzlich ein Marker auf das Agarosegel aufgetragen werden. Dieser enthält DNA-Fragmente in definierter Größen, sodass die erhaltenen Banden der Proben mit den Markerbanden verglichen werden können.

4.3 Klonierung eines Inserts in ein Plasmid mithilfe des „CloneJET™ PCR Kit“

Während dieser Arbeit wurde die Klonierung des Promotors P_{bgaL2} in das Plasmid pDSW1728 mithilfe des „CloneJET™ PCR Kit“ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Identifikation von bakteriellen Klonen, die ein Transgen enthalten.

Der Klonierungsvektor pJET1.2 enthält das letale Gen *eco47IR*, welches durch die Einbringung von DNA unterbrochen wird. Auf diese Weise ist nur bei Zellen, die ein rekombinantes Plasmid enthalten, ein Wachstum möglich.

4.3.1 Beimpfen einer Bakterienkultur

Zum sterilen Beimpfen einer Bakterienkultur wurde an einer Bunsenbrennerflamme gearbeitet, um eine Kontamination zu vermeiden. Außerdem wurde das Reagenzglas, in dem sich 5 mL LB-Flüssigmedium befanden, in jedem Arbeitsschritt in der Brennerflamme abgeflammt. Des Weiteren wurde dem Medium 5 µL des Antibiotikums Chloramphenicol hinzugefügt, um ein Wachstum anderer Bakterien auszuschließen und die Plasmidstabilität zu gewährleisten. Die Bakterien wurden mithilfe eines sterilen Zahnstochers aufgenommen, welcher in das Reagenzglas fallen gelassen wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 2 g auf dem Schüttler.

4.3.2 Plasmid-Präparation (Zyppy™ Plasmid Mini Prep)

Für die Plasmid-Präparation mithilfe des „Zyppy™ Plasmid Mini Prep-Kit“ wurden zunächst zweimal je 2 mL der Bakterienkultur bei 6708 g für eine Minute zentrifugiert. Das Pellet aus 4 mL Kultur wurde in 600 mL dd H₂O gelöst. Anschließend wurden 100 µL Lysis-Puffer hinzugegeben und gut gemischt. Nach maximal zwei Minuten wurden 350 µL des 4 °C kalten Neutralisationspuffer beigemischt und für 5 Minuten bei 11337 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein „collection tube“ des verwendeten Kits pipettiert und bei 11337 g für 15

Sekunden zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μL „Endo-washbuffer“ und es wurde bei 11337 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Daraufhin wurden 400 μL „Zyppy-washbuffer“ hinzugegeben und bei 11337 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der gesamte Durchfluss wurde verworfen und bei 3287 g für 5 Minuten zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Nun wurde die Säule in ein 1,5 mL – Reaktionsgefäß gestellt und es wurden 15 μL dd H_2O hinzupipettiert. Die Elution der DNA erfolgte nach einer Inkubationszeit von einer Minute, woraufhin eine Zentrifugation von 15 Sekunden bei 11337 g folgte. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, sodass ein Endvolumen von 30 μL erhalten wurde.

4.3.3 Flüssigaufreinigung (NucleoSpin® ExtractII Kit) von DNA

Bei der Flüssigreinigung von DNA aus einem PCR- oder Restriktionsverdau-Ansatz wurde auf das Probevolumen das doppelte Volumen an NTI-Puffer pipettiert. Das gesamte Volumen wurde anschließend auf die Nucleo-Spin-Säule gegeben und bei 11337 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Nun erfolgte die Zugabe von 700 μL NT3-Puffer, mit anschließender Zentrifugation bei 11337 g für 30 Sekunden. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde die Membran bei 11337 g eine Minute in der Zentrifuge getrocknet. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 15 μL dd H_2O und einer darauffolgenden Inkubationszeit von einer Minute. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 11337 g für eine Minute zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

4.3.4 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Für den Restriktionsverdau wurden in dieser Arbeit ATP-unabhängige Restriktionsendonukleasen der Klasse II verwendet. Diese schneiden die DNA in einer definierten Sequenz. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham MA, USA) bezogen und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Bei der Durchführung eines Doppel-Verdaus wurde nach dem Protokoll der Firma vorgegangen. Der präparative Restriktionsverdau wurde als Vorbereitung der Ligation sowohl mit dem Vektor oder Plasmid, als auch mit dem Insert durchgeführt, wobei jeweils das gleiche Restriktionsenzym, bzw. die gleichen Restriktionsenzyme verwendet wurden. Der Verdau wurde eine Stunde durchgeführt, wobei er bei der Verwendung von „Fast Digest“-Enzymen nur 10-15 Minuten benötigte. Die optimale Temperatur variierte abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym und wurde vom Hersteller angegeben. Der Verdau wurde durch die Inaktivierung der Restriktionsenzyme abgeschlossen, wobei auch hier die erforderliche Temperatur vom Hersteller angegeben wurde. Nach dem Restriktionsverdau folgte entweder direkt die Flüssigreinigung (4.3.3), oder die Aufreinigung aus dem Agarosegel (4.3.5)

Tabelle 9 Ansatz des präparativen Restriktionsverdaus

DNA /2-2,5 µg)	10-20 µL
Restriktionsenzym (10 U µL ⁻¹)	2 µL
10x Puffer	4 µL
dd H ₂ O	ad 40 µL

Der analytische Restriktionsverdaus wurde nach einer Ligation und Transformation eingesetzt, um zu kontrollieren, ob die Klonierung erfolgreich war. Die verdaute DNA wurde mittels Gelelektrophorese (4.2) aufgetrennt und nach der Färbung in einem Ethidiumbromidbad durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die unterschiedlichen Fragmentlängen gaben dabei Aufschluss über den Erfolg der Klonierung.

Tabelle 10 Ansatz des analytischen Restriktionsverdaus

DNA (0,5-0,75 µg)	1-2 µL
Restriktionsenzym (10 U µL ⁻¹)	1 µL
10x Puffer	1 µL
dd H ₂ O	ad 10 µL

4.3.5 Reinigung von DNA aus dem Agarosegel (NucleoSpin Gel + PCR cleanup Kit)

Für die Isolierung eines bestimmten DNA-Fragments aus einem Gemisch von Fragmenten verschiedener Größe, wurde dieses zunächst durch die Gelelektrophorese aufgetrennt. Das gewünschte DNA-Fragment war somit in einer bestimmten DNA-Bande enthalten, welche nach einer Färbung in Ethidiumbromid auf dem UV-Schirm ($\lambda = 365 \text{ nm}$) sichtbar gemacht, ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben wurde. Pro 100 mg Agarosegel wurden nun 200 µL „NTI Buffer“ aus dem verwendeten Kit hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde ca. 10 Minuten bei 50°C auf den Heizblock gestellt und alle zwei bis drei Minuten unter Verwendung eines Vortexmischers gemischt. Waren keine festen Teile des Gels mehr zu sehen, wurde die gesamte Flüssigkeit auf die NucleoSpin-Säule gegeben und 30 Sekunden bei 8117 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden 700 µL „NT3 Buffer“ hinzugegeben und wieder 30 Sekunden bei 8117 g zentrifugiert. Gegebenenfalls wurde die Zugabe des „NT3 Buffer“ zweimal durchgeführt. Nun folgte eine Zentrifugation von einer Minute bei 8117 g, um die Säule zu trocknen. Als letzter Schritt wurde die Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und zweimal mit 15 µL dd H₂O für eine Minute inkubiert. Darauf folgt jeweils eine Zentrifugation bei 8117 g für eine Minute.

4.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mithilfe des „NanoDrop 2000“ (Thermo Scientific, Rockford, USA) wurde die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt. Hierbei wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen (A_{260}/A_{280}) gab die Reinheit der Nukleinsäurelösung an. Optimal sind dabei Werte zwischen 1,7 und 2,0 für DNA und 2,0 und 2,2 für RNA. Als Referenz wurde dd H₂O verwendet.

4.3.7 Ligation von DNA

Bei der Ligation zweier DNA-Fragmente handelt es sich um die Einbringung von Insert-DNA in einen Vektor oder ein Plasmid. Dies wurde durch den Einsatz der T4-DNA-Ligase in einem 20 μ L-Ansatz durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Rückgrat und Insert betrug entweder 1:2 oder 1:3. Als Kontrolle für Religationen des Vektors oder Plasmids wurde eine Ligation ohne Insert-DNA angesetzt. Der Ligationsansatz, welcher in Tabelle 11 zu finden ist, wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 Minuten. Direkt danach wurde der Reaktionsansatz für die Transformation kaltkompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

Tabelle 11 Ligationsansatz

Insert-DNA	8 bzw. 12 μ L
Vektor- oder Plasmidrückgrat	4 μ L
Ligasepuffer 10x	2 μ L
T4-DNA-Ligase	1 μ L
dd H ₂ O	ad 20 μ L

Bei der Ligation des Inserts in den pJET-Vektor wurde der Ansatz vom Hersteller vorgegeben. Dieser ist in Tabelle 12 zu finden. Die Inkubation erfolgte hier für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Tabelle 12 Ligationsansatz der pJET-Klonierung

2x Reaktionspuffer	10 μ L
Blunt-end-PCR-Produkt	0,15 pmol Enden
pJET1.2/blunt Cloning Vektor (50 ng/ μ L)	0,05 pmol Enden
dd H ₂ O	ad 19 μ L
T4-DNA-Ligase	1 μ L

4.3.8 Sequenzierung von DNA

Für Sequenzierung der DNA wurde die Sequenzierreaktion nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) verwendet, welche von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt wurde. Dafür wurden 20 µL der jeweiligen Probe mit einer Konzentration von 50 ng/µL eingeschickt.

4.4 Messung der relativen Fluoreszenz mithilfe des TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd.

Um eine Messung der relativen Fluoreszenz am TECAN-Reader durchzuführen, mussten zunächst einmal die Bakterienstämme aus den Stammkonzentrationen in 5 mL LB-Flüssigmedium herangezogen werden.

Am nächsten Morgen wurden aus diesen Vorkulturen pro Stamm und Bedingung jeweils dreimal 5 mL LB-Flüssigmedium in einer Verdünnungskonzentration von 1:100 beimpft.

Nach 4 Stunden folgte die Induktion. Hierbei wurde bei den Bakterienstämmen, welche ein Plasmid mit einem induzierbaren Promoter enthielten, die jeweilige Substanz in definierten Mengen hinzugegeben. Auch bei der Negativkontrolle wurden die Induktoren Anhydrotetracyclin und Laktose in jeweils der höchsten verwendeten Konzentration hinzugegeben.

Am darauf folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ der Proben in einer 1:50 Verdünnung mit einer 0,8 %-igen NaCl-Lösung gemessen. Anschließend wurde die OD₆₀₀ auf einen Wert von 0,5 eingestellt und zweimal mit 0,5 mL 0,8 %-iger NaCl-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde erneut die OD₆₀₀ gemessen, wobei ein Wert von ca. 0,5 erwartet wurde.

Für die Messung am TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd., Schweiz; wurden von den gewaschenen Zellen jeweils 200 µl in eine 96-Well-Microtiter-Platte gegeben. Da das Reportergen *mCherryOpt* für ein rot fluoreszierendes Protein kodiert, wurden die Messungen im roten Wellenlängenbereich durchgeführt, was einer Anregung zwischen 580 – 630 nm entspricht. Die höchste Emission wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 610$ nm erzielt.

Nach den Fluoreszenz-Messungen am TECAN-Reader, wurden die Ergebnisse in einer Excel-Tabelle festgehalten und ausgewertet. Um vergleichbare Werte der relativen Fluoreszenz zu erhalten, wurde die gemessene Emission in Bezug auf die OD₆₀₀ der jeweiligen Probe betrachtet.

4.5 DNA-Transfer in Zellen

4.5.1 Herstellung kaltkompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Herstellung kaltkompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen wurde die *E. coli*-Kultur auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde von der Agarplatte gepickt und in 5 mL LB-Medium als Vorkultur angezogen. In einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 250 mL mit der Vorkultur beimpft, sodass eine OD₆₀₀ von etwa 0,1 erhalten wurde. Die Inkubation erfolgte bei 18°C über Nacht, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 bis 0,7 erreicht wurde. Ist dies geschehen, wurde die Kultur 10 Minuten auf Eis gestellt, bevor sie dann auf 5 Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 4000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Die Zellpellets wurden in je 40 mL TB-Puffer suspendiert und auf Eis für 10 Minuten inkubiert, woraufhin ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4000 g und 4°C für 10 Minuten folgte. Zum Schluss wurde jedes Sediment in 10 mL TB-Puffer gelöst und nach einer Zugabe von 1,5 mL DMSO (Dimethylsulfoxid) in 200- μ L-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TB-Puffer:

PIPES (1,4-Piperazindiethansulfonsäure)	746 mg	10 mM
CaCl ₂	420 mg	15 mM
dd H ₂ O	ad 125 ml	

Mithilfe von KOH wird der pH-Wert auf 6,7 eingestellt.

KCl	4,66 g	250 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,72 g	34,7 mM
dd H ₂ O	ad 125 ml	

Nach getrenntem Autoklavieren beider Lösungen, wurden diese zusammengegeben.

4.5.2 Transformation kaltkompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation kaltkompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen wurde auf Eis ausgeführt. Pro Transformation wurden zu je 100 μ L kaltkompetenten Bakterienzellen 5-10 μ L des Ligationsansatzes (4.3.7) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden auf dem Heizblock, worauf hin die Zellen für 10 Minuten auf Eis abgekühlt wurden. Nun wurde jedem Transformationsansatz 400 μ L LB-

Flüssigmedium zugegeben und anschließend für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Je 100 µL *E. coli*-Kultur wurden anschließend auf eine LB-Antibiotikaplatte ausplattiert. Die restliche *E. coli*-Kultur wurde anschließend für 5 Minuten bei 2415 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µL verworfen und das Pellet wurde in der restlichen Flüssigkeit suspendiert. Hiervon wurden wiederum 100 µL auf einer weiteren LB-Antibiotikaplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht.

4.5.3 Transformation in elektrokompetente *Acetobacterium woodii*-Zellen

Die Transformation in *A. woodii*-Zellen wurde in der Anaerobenkammer durchgeführt. Drei Tage vor der Transformation wurden 5 mL 1612 mod. 2.0 Medium mit den Bakterien aus der Stammkonzentration beimpft. An den beiden darauffolgenden Tagen wurde der Bakterienstamm in ein neues Hungate-Röhrchen überimpft, welche wiederum 5 mL 1612 mod. 2.0 Medium enthielten.

Am Vortag der Transformation wurden 1-2 mL der Vorkultur in 100 mL 1612 mod. 2.0 Medium beimpft. Ausserdem wurden 8 mL DL-Threonin (0,5 M) und 2 mL Fruktose (1,11 M) hinzugegeben.

Am nächsten Morgen, als die OD₆₀₀ der Bakterienkultur einen Wert zwischen 0,3 und 0,5 betrug, wurde diese auf Eis gestellt. Der SMP-Puffer (pH 6,0) wurde ebenfalls auf diese Weise gekühlt. In der Anaerobenkammer, welche Formiergas (95 % Stickstoff, der Rest Wasserstoff) enthält, wurde die Bakterienkultur auf 50 mL Falcons aufgeteilt. Diese wurden bei 4°C und 1947 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit 50 mL SMP-Puffer gewaschen und erneut bei 4°C und 1947 g für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Zellen in 0,6 mL SMP-Puffer aufgenommen und es wurden 120 µL Anti-Freezing-Puffer hinzugegeben. Danach wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Pro Transformation wurden 25 µL kompetente Zellen zur Plasmid-DNA hinzugefügt, wobei ein Volumen von maximal 20 µL dieser verwendet werden durfte. Der Transformationsansatz wurde in eine 1 mm-Elektroporationsküvette überführt und ein Puls von 0,625 kV, 600 Ω und 25 µF angelegt. Zum Aufnehmen der Zellen wurden 0,5 mL 1612 mod. 2.0 Medium in die Küvette gegeben und anschließend in ein Hungate überführt. Die restlichen Zellen wurden in kleine Hungate-Röhrchen gegeben und im -80°C-Schrank gelagert.

Nach der Transformation wurde die OD₆₀₀ in einem Hungate-Röhrchen gemessen, um den Wachstumsfortschritt zu dokumentieren. 24 h nach der Transformation erfolgte die Selektion mit einem Tropfen Thiamphenicol.

SMP-Puffer

Saccharose	92,34	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20	g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,25	g
dd H ₂ O	ad 1000	ml

Mithilfe von HCl wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

Der Puffer wird 20 min gekocht und mit N₂/CO₂ (80 % / 20 %).

Anti-Freezing-Puffer

DMSO	60	%
SMP-Puffer (pH 6,0)	40	%

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung des Promotors P_{bgaL2} aus *Clostridium perfringens* in das Plasmid pDSW1728

Der Promotor P_{bgaL2} , welches aus dem acetogenen Bakterium *C. perfringens* stammt und in dem Plasmid pKOD-mazF enthalten war, wurde in das Plasmid pDSW1728 unter Verwendung des Klonierungsvektors pJET (4.3) eingebracht. Das fertige Plasmid pDSW1728_ P_{bgaL2} ist in Abbildung 1 zu sehen.

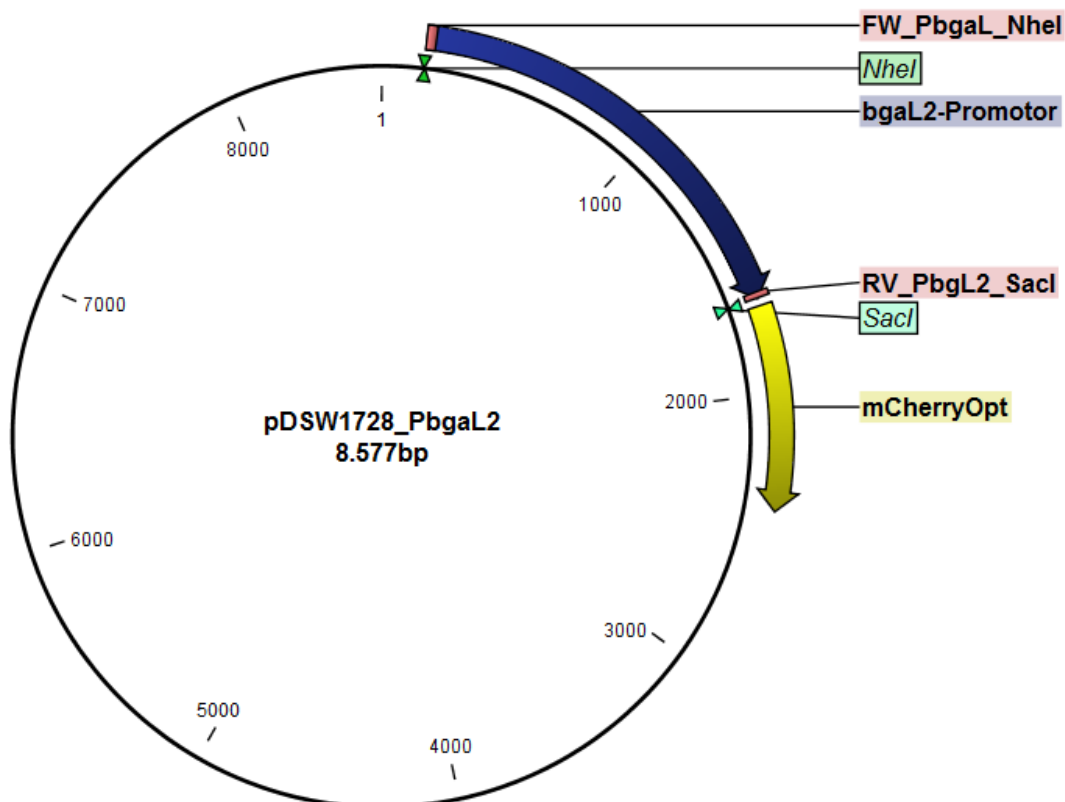


Abbildung 1 Schematische Darstellung des fertigen Plasmids pDSW1728_ P_{bgaL2} . Der Promotor P_{bgaL2} ist blau dargestellt, und wird von den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NheI* und *SacI* flankiert. Des Weiteren sind die rot eingefärbten Primer *FW_PbgaL_NheI* und *RV_PbgL2_SacI* zu erkennen. Das Reportergen *mCherryOpt* ist gelb dargestellt.

5.1.1 Amplifikation des Promotors aus dem Plasmid

Zunächst wurde der Promotor P_{bgaL2} (1508 Bp) aus dem Plasmid pKOD-mazF amplifiziert. Hierbei wurden eine PCR (4.1) mit der KAPA-Hifi-Polymerase (Tabelle 2) durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Primer „RV_PbgaL2_SacI“ und „FW_PbgaL_NheI“ verwendet. Die *Annealing*-Temperatur betrug 63 °C. Das Gemisch wurde

mithilfe einer Agarosegelelektrophorese (4.2) aufgetrennt. Die Bande auf Höhe von ca. 1500 Bp wurde ausgeschnitten und wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben gereinigt.

5.1.2 Klonierung des Promotors in pDSW1728 über den Klonierungsvektor pJET1.2

Nach der Reinigung der Inserts aus dem Agarosegel (4.3.5), wurde dieses in den Klonierungsvektor pJET 1.2 des „CloneJET™ PCR Kit“ ligiert (4.3.7). Hierbei wurden die in Tabelle 3 aufgeführten *Primer* „pJET1.2 Forward Sequencing *Primer*“ und „pJET1.2 Reverse Sequencing *Primer*“ verwendet. Der Klonierungs-Ansatz ist in Tabelle 12 zu finden. Der Ligationsansatz wurde in kaltkompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (4.5.2) und diese auf einem Ampicillin-Selektivmedium ausplattiert. Insgesamt wuchsen auf den Agarplatten fünf Kolonien, welche potentiell den Klonierungsvektor pJET1.2 mit dem Insert, dem Promotor P_{bgaL2}, tragen. Mittels Kolonie-PCR (4.1) wurden diese auf das Plasmid überprüft. Hierbei verwendete man ebenfalls die *Primer* „pJET1.2 Forward Sequencing *Primer*“ und „pJET1.2 Reverse Sequencing *Primer*“ (Tabelle 3), welche in dem Klonierungskit enthalten waren. In Abbildung 2 ist das Bild der Agarosegelelektrophorese zu sehen. Die Spuren 1-5 enthalten Amplifikate der DNA die Klone der Transformation. In Spur 6 wurde das Amplifikat der Positivkontrolle aufgetragen. Die amplifizierte DNA des Klons aus Spur 1 weist, ebenso wie die der Positivkontrolle mit pKOD-mazF als Template der Kolonie-PCR, eine Bande in Höhe von ca. 1500 Bp auf. Die errechnete Größe des P_{bgaL2}-Promotors beträgt 1508 Bp.

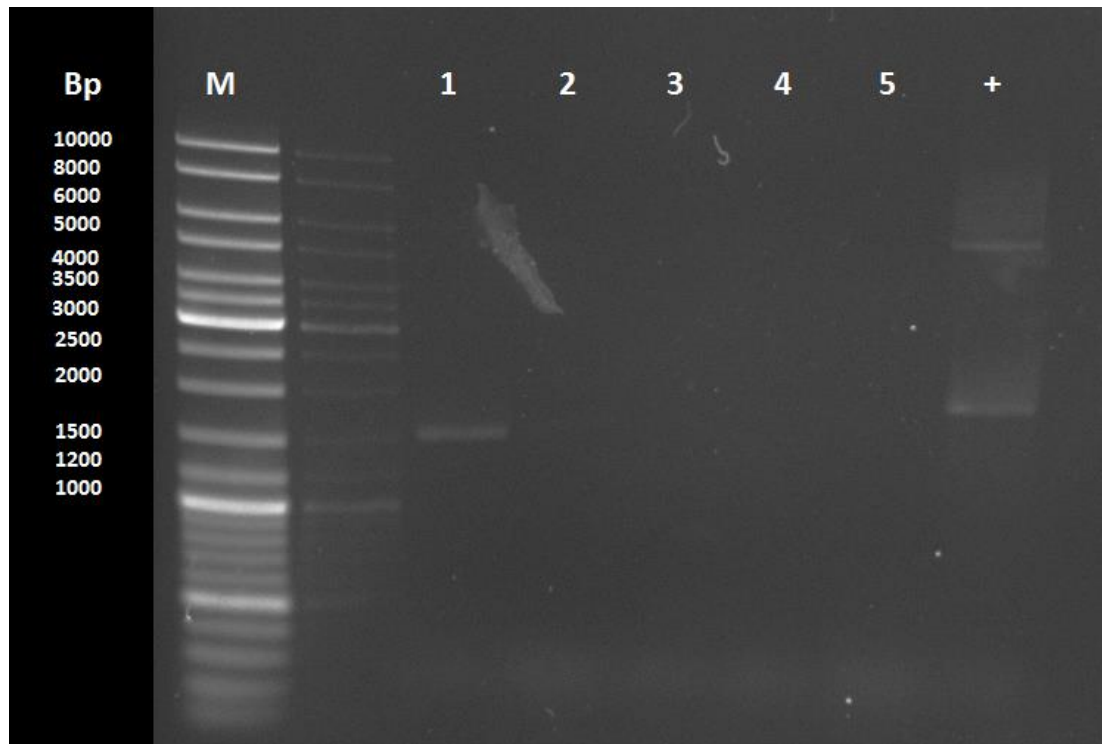


Abbildung 2 Bild der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR zur Kontrolle der Klonierung des Promotors *P_{bgal2}* in den Klonierungsvektor pJET Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1-5: Amplifikate der Kolonie-PCR der Klone 1-5, Positivkontrolle (+): Kolonie-PCR mit Plasmid pKOD-mazF als Matriz

Anschließend wurde sowohl mit der Plasmid-DNA des Klons 1 und auch mit dem Plasmid pDSW1728 ein präparativer Verdau (4.3.4) mit den in Tabelle 2 aufgeführten Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI* durchgeführt. Das Ergebnis wurde mittels der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, anschließend durch Ethiliumbromid gefärbt und sichtbar gemacht und ist in Abbildung 3 zu sehen. Probe 1 enthält das verdaute Plasmid pDSW1728 und weist eine Bande auf Höhe von 7000 Bp auf. Das gewünschte DNA-Fragment besitzt eine Größe von 7065 Bp. Bei Probe 2 handelt es sich um das verdaute pJET-Plasmid, welches den *P_{bgal2}*-Promotor enthält. Hier sind deutlich zwei Banden zu erkennen. Die obere Gelbande ist auf einer Höhe von ca. 3000 Bp und enthält den Klonierungsvektor pJET1.2. Bei der unteren Bande, welche auf der Höhe von ca. 1500 Bp zu finden ist, handelt es sich um das gewünschte Insert, den *P_{bgal2}*-Promotor, mit einer Größe von 1508 Bp.

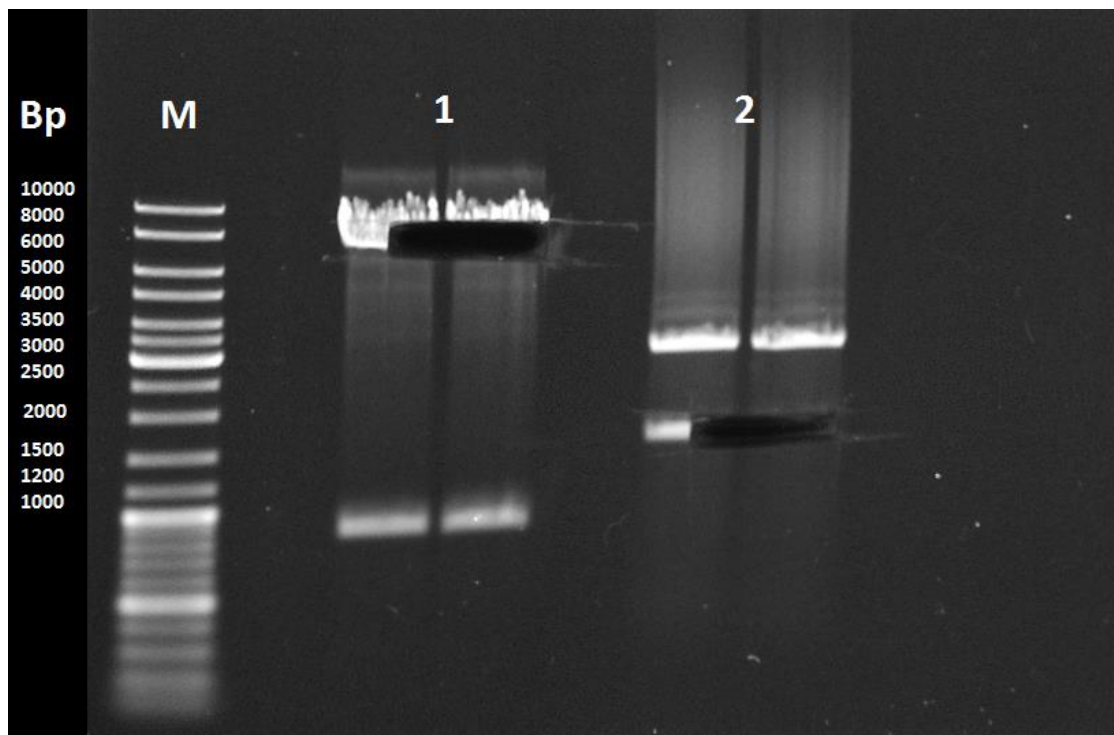


Abbildung 3 Bild der Agarosegelelektrophorese des präparativen Verdaus mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI*. Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1: verdautes Plasmid pDSW1728_*tet* mit einer Größe von 7065 Bp; Spur 2: verdauter pJET-Vektor (Größe: 3000 Bp) mit dem ausgeschnittenen Promotor *P_{bgaL2}* (Größe: 1508 Bp)

Nach der Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel (4.3.5), wurden diese ligiert und in kaltkompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (4.5.2). Mittels Kolonie-PCR, welche bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C mit den beiden *Primern* „Fw_PgbaL_NheI“ und „RV_PbgaL2_SacI“ aus Tabelle 3 durchgeführt wurde, erfolgte die Überprüfung der 12 Klone, welche auf dem Chloramphenicol-Selektivmedium wuchsen. Der PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Das dazu gehörige Gelbild zeigt Abbildung 4. Wie an der Positivkontrolle, den Amplifikaten des Plasmids pDSW1728_*P_{bgaL}*, deutlich zu erkennen ist, war diese erfolgreich. Auch weisen die Spuren, welche die PCR-Proben der Klone 3, 4, 9 und 11 enthalten, eine Bande in Höhe von 1500 Bp auf. Die errechnete Größe des Promotors *P_{bgaL2}* beträgt 1508 Bp.



Abbildung 4 Agarosebild der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR nach der Transformation des Plasmides pDSW1728_*P_{bgaL2}* in kaltkompetente *E. coli* DH5 α -Zellen. Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1-12: Amplifikate der Kolonie-PCR der Klone 1-12, Positivkontrolle (+): *P_{bgaL}*, Negativkontrolle (-): PCR-Ansatz ohne Template-DNA

Die Klone 4, 9 und 11 wurden in 5 mL LB-Flüssigmedium über Nacht kultiviert und deren Plasmid-DNA einem Kontrollverdau (4.3.4) unterzogen. Dabei wurden die Restriktionsenzyme *NheI* und *SacI* aus Tabelle 2 verwendet. Das Agarosebild der Gelelektrophorese (Abbildung 5) zeigt anhand der Positivkontrolle, dem identischen Verdau des Plasmids pDSW1728_*P_{bgaL}*, dass der Kontrollverdau positiv verlaufen ist. Alle Proben weisen zwei Banden auf, wobei die Obere sich immer in der Höhe von ca. 7000 Bp befindet. Bei der unteren Bande variiert die Größe zwischen der Positivkontrolle und den Klonen um etwa 100 Bp. Diese Bande ist in den Spuren 1-3 auf einer ungefähren Höhe von 1500 Bp zu finden. Da das Bandenmuster des Klons 9 auf dieser Abbildung nicht so stark wie das der anderen beiden ist, wurden nur die Klone 4 und 11 zur Sequenzierung eingeschickt.

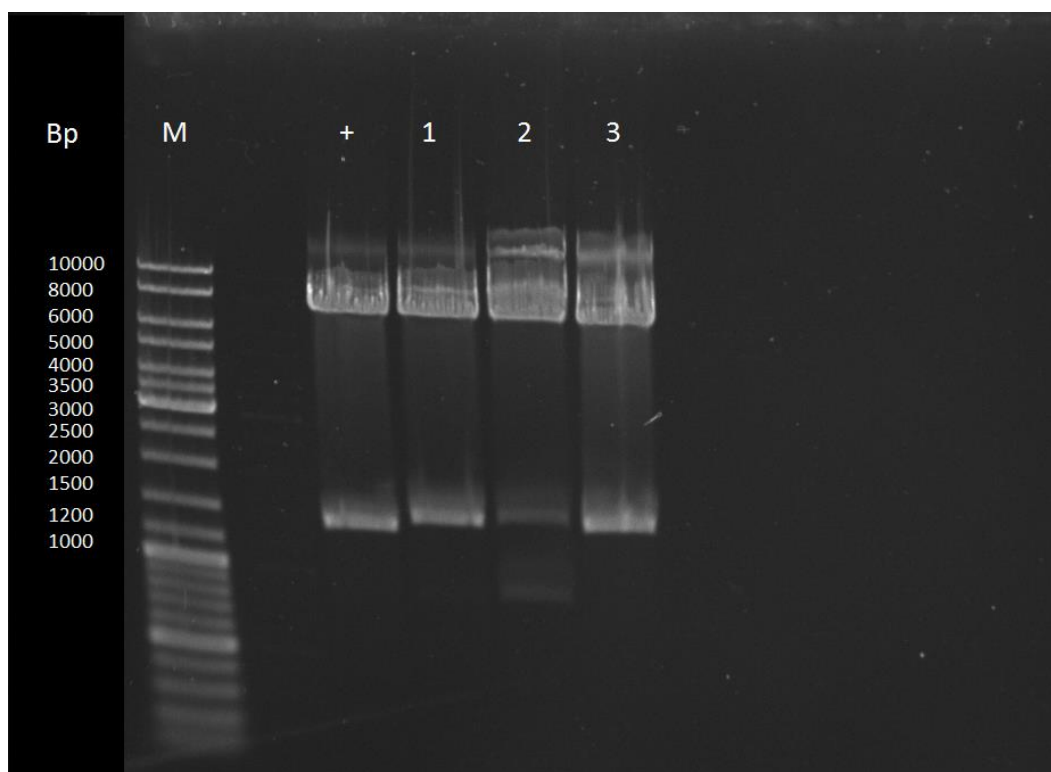


Abbildung 5 Gelelektrophoresebild des Kontrollverdaus der pDNA der Klone 4, 9 und 11. Gel: 0,8 %-iges Agarosegel. M: GeneRuler DNA-Ladder, Spur 1-3: Amplifikate der Kolonie-PCR der Klone 4, 9 und 11, Positivkontrolle (+): pDSW1728_*P_{bgaL}*.

5.2 Bestimmung der Aktivität verschiedener Promotoren in *E. coli*

Zur Überprüfung der Effizienz verschiedener Promotoren wurden diese in *E. coli* DH5 α -Zellen getestet. Bei einigen handelte es sich um induzierbare Promotorsysteme. Sowohl die verwendeten Plasmide mit den entsprechenden Promotoren, als auch die ggf. verwendeten Induktormengen im Fall induzierbarer Promotoren sind in Tabelle 13 aufgeführt. Neben den wechselnden Promotorstrukturen sind die Plasmide identisch. Auf den jeweiligen Promotor folgt das Reportergen *mCherryOpt*. Dieses trägt neben dem Translationsstart die Ribosomenbindestelle. Mithilfe des rot fluoreszierenden Reporterproteins mCherry soll die Effizienz der verschiedenen Promotoren getestet werden. Um einen vergleichbaren Wert der gemessenen relativen Fluoreszenz zu erhalten, wurde die gemessene Emission in Bezug auf die OD₆₀₀ der jeweiligen Probe betrachtet.

Die Promotoren *P_{tet}*, *P_{bgaL}* und *P_{bgaL2}* wurden mit den Substanzen Anhydrotetracyclin bzw. Laktose, wie in Tabelle 13 angegeben, induziert. Dabei handelt es sich bei den beiden Promotoren *P_{bgaL}* und *P_{bgaL2}* prinzipiell um denselben Promotorbereich, jedoch bestand die Möglichkeit mittels einer Variation in der Länge der verwendeten DNA-Sequenz ein besseres

Ergebnis der Promotoraktivität zu erzielen. Wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt wurde, befindet sich im hinteren Bereich der langen Version, dem P_{bgaL2} -Promotor, das Triplet ATG, welches für den Translationsstart kodiert. Ausserdem sind in dieser Region Basenpaarfolgen zu finden, welche an die Konsensussequenzen eines Promotors erinnern. Es stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um einen zusätzlichen regulatorischen Bereich handelt. Aus diesem Grund wurde, zusätzlich zu dem schon bestehenden Plasmid pDSW1728_ P_{bgaL} , welches den kürzeren Promotor P_{bgaL} enthält, das Plasmid pDSW1728_ P_{bgaL2} mit dem Promotor P_{bgaL2} kloniert. Die Stärke beider Promotoren wurde anschließend gemessen und miteinander verglichen.

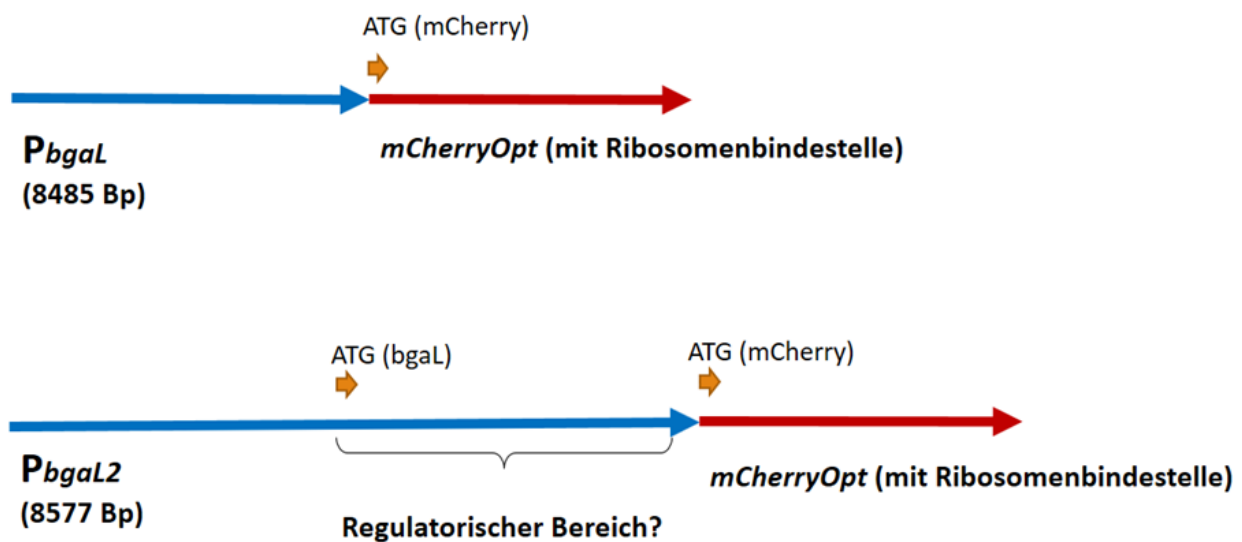


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Unterschieds zwischen den Promotoren P_{bgaL} und P_{bgaL2} .

Des Weiteren sind in dieser Tabelle drei Varianten des konstitutiven Promotors $P_{pta-ack}$ zu finden. Auch hierbei handelt es sich prinzipiell um denselben Promotorbereich, welcher jedoch in seiner Länge variiert wurde. Der Promotor $P_{pta-ackL}$ deckt die vollständige Sequenz des Promotors (Öztürk, 2013) ab. Diese wurde, wie in Abbildung 7 zu sehen ist, in zwei kürzere Fragmente unterteilt, wobei der Transkriptionsstart TK bei beiden Varianten vorhanden ist. Die experimentell bestimmte Promotorregion (Öztürk, 2013) ist sowohl bei dem Originalpromotor $P_{pta-ackL}$, welcher 7235 Bp enthält, als auch auf dem 58 Bp-kürzeren Promotor $P_{pta-ackS1}$ zu finden. Bei der zweiten verkürzten Version $P_{pta-ackS2}$ (7134 Bp) wurde über die DNA-Sequenz eine weitere Promotorstruktur vermutet. Das Startcodon und die Ribosomenbindestelle, welche für die Translation benötigt werden, sind auf der Gensequenz des Gens vorhanden, das das Reporterprotein mCherry kodiert. Um zu kontrollieren, ob die

verkürzten Formen des $P_{pta-ack}$ -Promotors eine Aktivität besitzen, wurden diese ebenfalls mittels des Reportergens *mCherryOpt* überprüft.

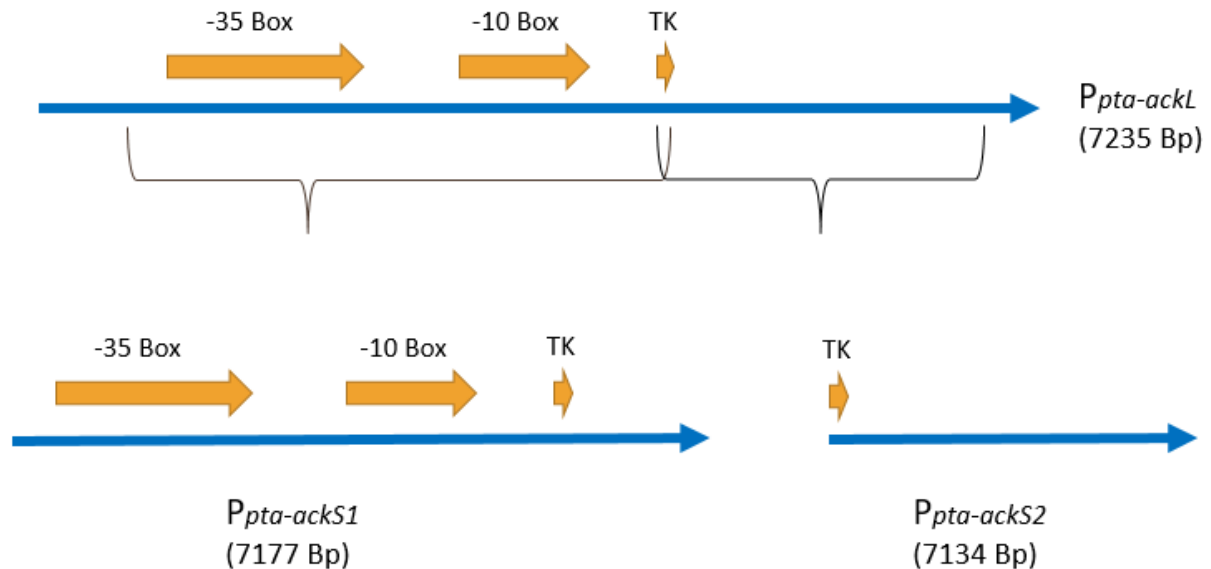


Abbildung 7 Schematische Darstellung der drei Varianten des $P_{pta-ack}$ -Promotors von *C. ljungdahlii*

Neben dem Promotor $P_{pta-ack}$ und seinen beiden Varianten handelt es sich auch bei den beiden Promotoren P_{thlA} und P_{ptb} um konstitutive Promotoren, weshalb hier keine Induktoren benötigt werden. Beide stammen aus dem Bakterium *Clostridium acetobutylicum*.

Das Plasmid pDSW1728_C1 wurde als Negativkontrolle verwendet. Es handelt sich um das Plasmid pDSW1728 aus dem der Promotor P_{tet} entfernt wurde. Das rot fluoreszierende Reporterprotein mCherry ist weiterhin vorhanden. Im Fall der Kontrolle wurden jeweils die höchsten Mengen der beiden Induktoren Anhydrotetracyclin und Laktose eingesetzt. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass das Reportergen trotz der fehlenden Promotorstruktur abgelesen werden konnte, oder das Bakterium aus einem anderen Grund eine Fluoreszenz aufweist.

Tabelle 13 Verwendete Plasmide mit entsprechenden Promotoren und ggf. Induktormengen im Fall induzierbarer Promotoren

Plasmid	Promotor	Induktor	Induktormenge
pDSW1728	P_{tet}	Anhydrotetracyclin	0 ng/ml
			100 ng/ml
			200 ng/ml
			400 ng/ml
pDSW1728_ P_{bgaL}	P_{bgaL}	Laktose	0 mM
			1 mM
			10 mM
			20 mM
pDSW1728_ P_{bgaL2}	P_{bgaL2}	Laktose	0 mM
			1 mM
			5 mM
			10 mM
			20 mM
pDSW1728_ P_{thlA}	P_{thlA}	---	
pDSW1728_ $P_{pta-ackL}$	$P_{pta-ackL}$	---	
pDSW1728_ $P_{pta-ackS1}$	$P_{pta-ackS1}$	---	
pDSW1728_ $P_{pta-ackS2}$	$P_{pta-ackS2}$	---	
pDSW1728_ P_{ptb}	P_{ptb}	---	
pDSW1728_C1	---	Anhydrotetracyclin	400 ng/ml
		Laktose	20 mM

5.2.1 Konstitutive Promotoren

Bei den untersuchten konstitutiven Promotoren P_{thlA} , P_{ptb} , $P_{pta-ackL}$, $P_{pta-ackS1}$ und $P_{pta-ackS2}$ war keine Induktion von Nöten. Die gemessenen relativen Fluoreszenzen wurden in einem Diagramm dargestellt, wobei die Ordinatenachse die relative Fluoreszenz anzeigt.

In Abbildung 8 ist die relative Fluoreszenz der Negativkontrolle (*E. coli* DH5 α -Stamm mit dem Plasmid pDSW1728_C1) als Referenz für alle übrigen bestimmten relativen Fluoreszenzen eingetragen. Trotz einer Induktion mit den höchsten Induktormengen (20 mM Laktose und 400 ng/ml Anhydrotetracyclin) lag der Wert der relativen Fluoreszenz in beiden Fällen bei Null.

Auch gezeigt in diesem Diagramm (Abbildung 8) ist der stärkste gemessene Promotor der P_{thlA} -Promotor. Er lieferte den höchsten gemessenen relativen Fluoreszenzwert mit 6557,29. Die relative Fluoreszenz des Promotors P_{ptb} beträgt dagegen nur 1830,89.

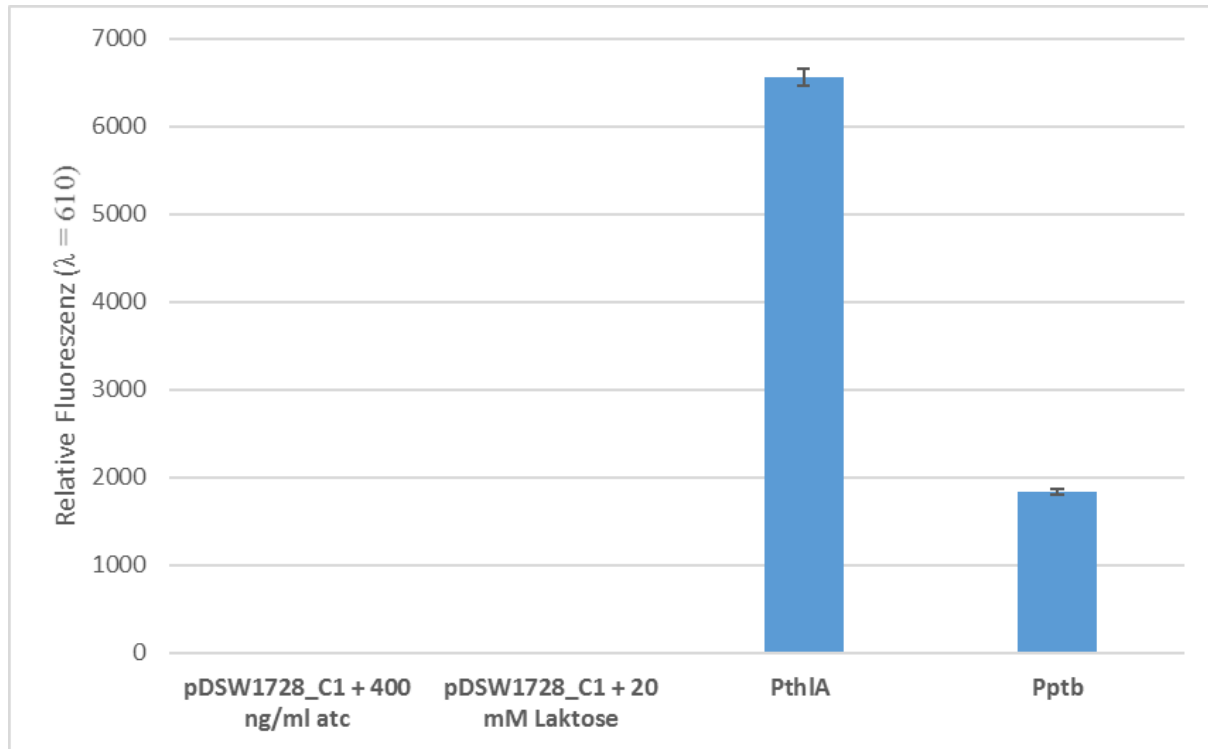


Abbildung 8 Relative Fluoreszenzen der Promotoren P_{thlA} und P_{ptb} und der Negativkontrolle pDSW1728_C1, welche zum Einen mit 400 ng/ml Anhydrotetracyclin und zum Anderen mit 20 mM Laktose induziert wurde. Alle Fluoreszenzen wurden bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.

In Abbildung 9 ist das Diagramm der relativen Fluoreszenz des $P_{pta-ack}$ -Promotors zu sehen. Es sind die relativen Fluoreszenzen für alle drei Varianten des Promotors abgebildet. Die Y-Achse zeigt die relative Fluoreszenz. Für die lange Form des Promotors ergab sich eine relative Fluoreszenz von 1695,94. Die relative Fluoreszenz des 58 -Bp kürzeren Promotors $P_{pta-ackS1}$ liegt bei 70,73. Weiterhin wurde für den 7134 Bp-großen $P_{pta-ackS2}$ -Promotor eine relative Fluoreszenz von 659,35 gemessen.

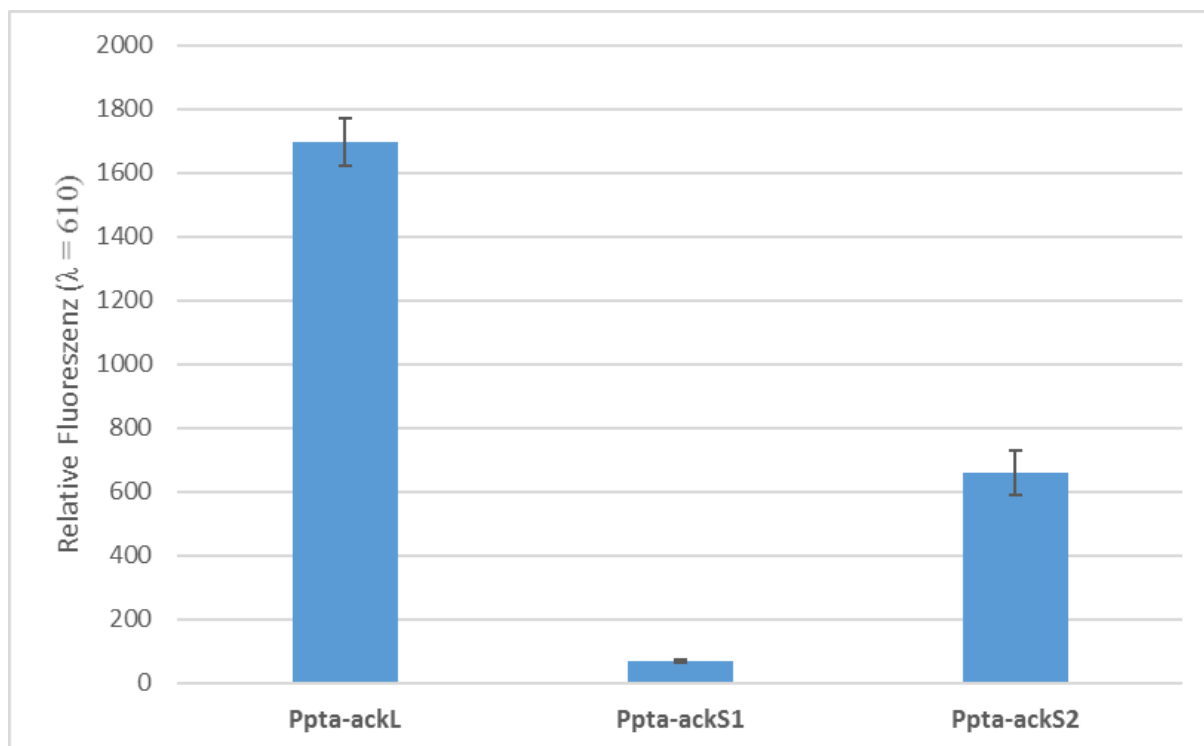


Abbildung 9 Relative Fluoreszenz der drei Varianten des $P_{pta-ack}$ -Promotors, gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.

5.2.2 Induzierbare Promotoren

Der *E. coli* DH5 α -Stamm mit dem Plasmid pDSW1728, das den Promotor P_{tet} trägt, wurde, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, für die Messungen am TECAN-Reader vorbereitet und zuvor mit unterschiedlichen Mengen Anhydrotetracyclin (Induktormengen siehe Tabelle 13) induziert. Die gewonnenen Werte wurden mittels Excel in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 10). Die Y-Achse gibt den Wert der gemessenen Relativen Fluoreszenz an. Auf der X-Achse sind in Säulenform die vier Bedingungen, unter denen der induzierbare Promotor gemessen wurde, dargestellt. Für den nicht induzierten P_{tet} -Promotor ergab sich eine relative Fluoreszenz von 26,65. Eine Steigung der relativen Fluoreszenz ergab sich bei der nächsten gemessenen Bedingung, einer Induktion mit 100 ng/ml Anhydrotetracyclin. Die relative Fluoreszenz betrug hier 213,09. Nach einer Induktion mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin wurde eine relative Fluoreszenz 291,42 erzielt. Im Fall einer Induktion mit 400 ng/ml Anhydrotetracyclin ergab sich die höchste relative Fluoreszenz mit einem Wert von 955,52.

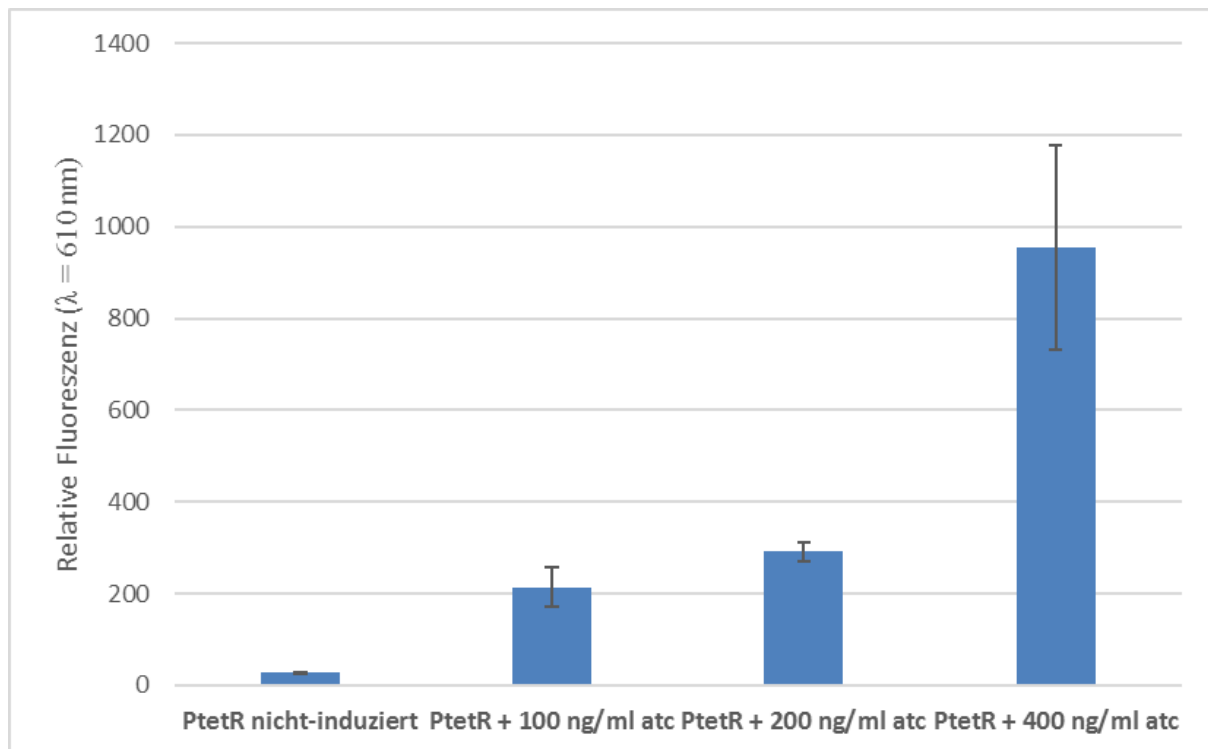


Abbildung 10 Relative Fluoreszenz des Promotors P_{tet} gemessen für verschiedene Induktormengen (Anhydrotetracyclin), gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.

Bei dem nächsten induzierbaren Promotor handelt es sich um den Promotor P_{bgaL} . Das Diagramm, welches in der Abbildung 11 zu finden ist, beschreibt ebenfalls auf der Y-Achse die relative Fluoreszenz und auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Induktionsbedingungen zu sehen. Erstere zeigt den nicht induzierten Promotor, welche dennoch eine relative Fluoreszenz von 535,72 erreicht. Nach der Induktion mit 1 mM Laktose wurde die höchste relative Fluoreszenz mit 806,89 gemessen. Darauf folgt, nach einer Zugabe von 10 mM des Induktors, ein Wert von 692,84. Der Wert der relativen Fluoreszenz nach der Zugabe einer Induktormenge von 20 mM Laktose, liegt bei 537,98.

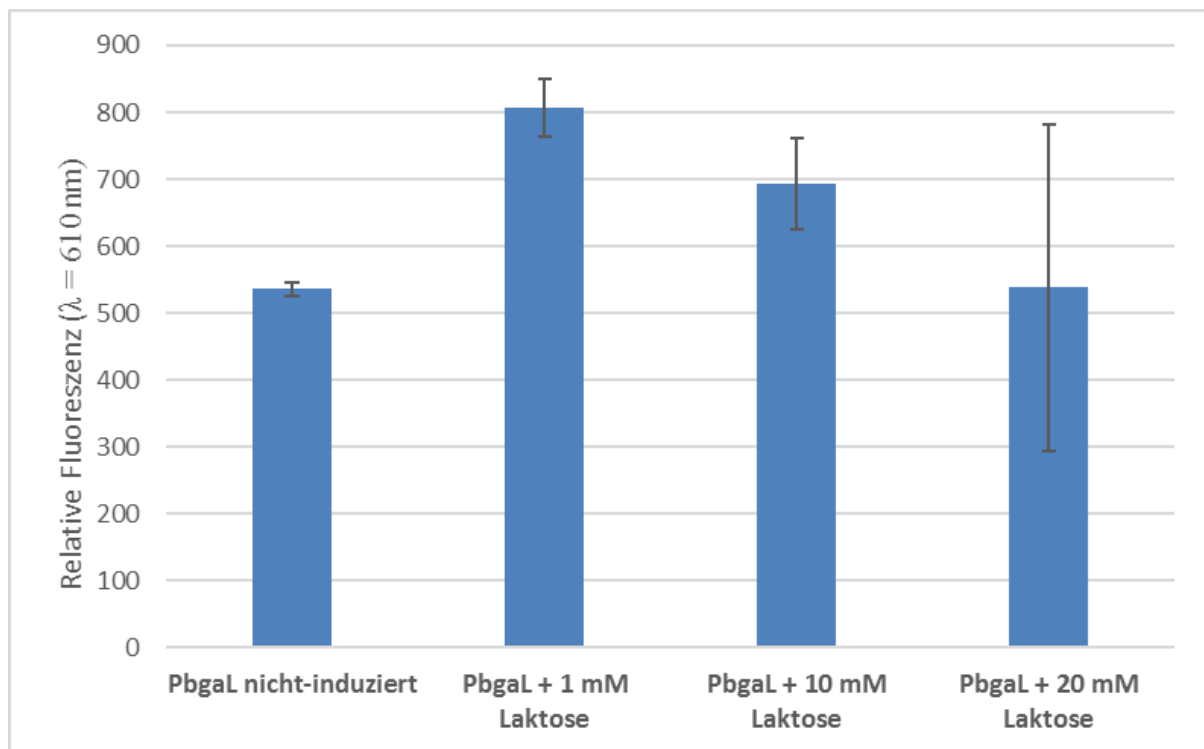


Abbildung 11 Relative Fluoreszenz des Promotors P_{bgaL} gemessen für verschiedene Induktormengen, gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.

In Abbildung 12 ist das Diagramm des Promotors P_{bgaL2} zu sehen. Für eine genauere Datenerhebung wurden neben den bereits beschriebenen Induktormengen (Promotor P_{bgaL}) auch eine Induktormenge von 5 mM Laktose untersucht. Auf der Y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen. Bei dem nicht induzierten Promotor wurde eine relative Fluoreszenz von 446,88 erzielt. Nach einer Induktion von 1 mM Laktose wurde ein Wert von 735,42 gemessen. Knapp darunter, mit 729,17, liegt der Wert nach einer Induktion mit 5 mM Laktose. Bei einer Induktion mit 10 mM Laktose wurde ein Wert von 482,29 erzielt. Die relative Fluoreszenz liegt bei der letzten Bedingung, einer Induktormenge von 20 mM Laktose, bei einem Wert von 562,5.

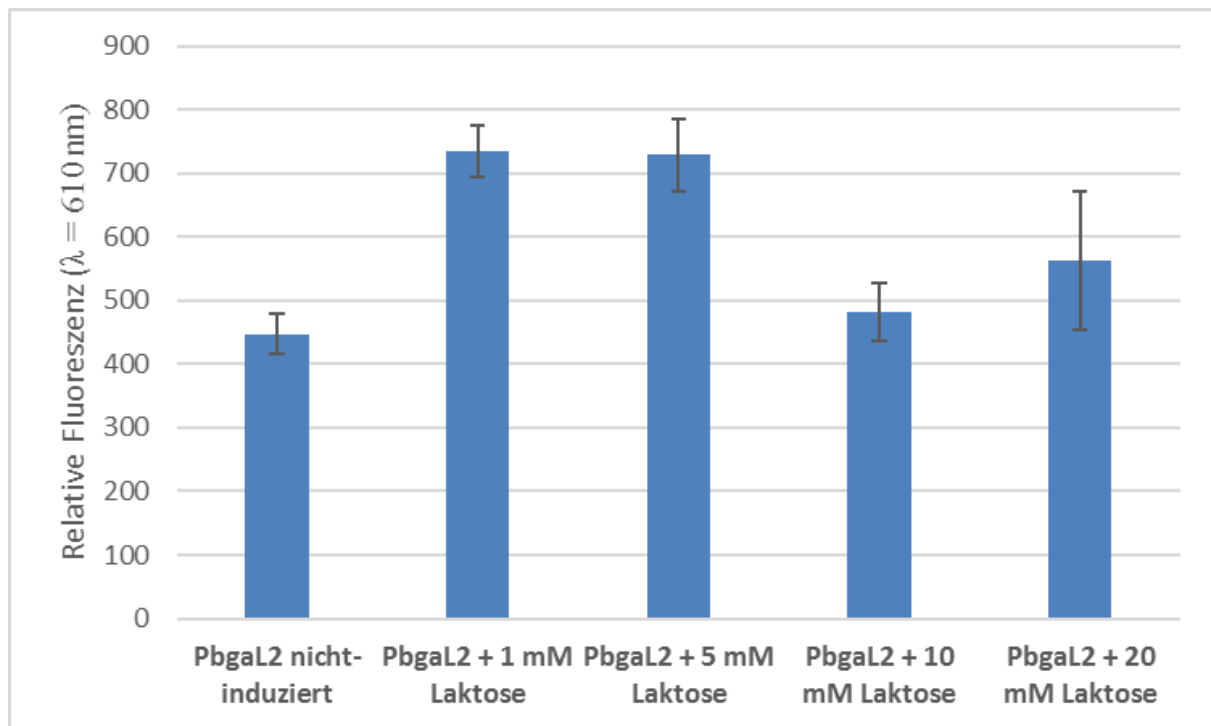


Abbildung 12 Relative Fluoreszenz des Promotors P_{bgaL2} gemessen für verschiedene Induktormengen, gemessen bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Fehlerbalken zeigen die jeweils mögliche Abweichung.

5.3 Transformation verschiedener Plasmide in *A. woodii*

Neben den Experimenten zur Analyse der Stärke der verschiedenen Promotoren in *E. coli* DH5α, sollen diese auch in dem Mikroorganismus getestet werden, in welchem sie später verwendet werden sollen.

Hierfür wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Plasmide, wie im Kapitel 4.5.3 beschrieben, in das acetogene Bakterium *Acetobacterium woodii* eingebracht. Die Transformation wurde insgesamt zweimal, mit jeweils dreifachem Ansatz pro Plasmid und ggf. verwendeten Induktormengen im Fall induzierbarer Promotoren, durchgeführt, jedoch konnte kein Wachstum der Mikroorganismen beobachtet werden. Die Transformation mit dem Kontrollplasmid pJIR750 (Positivkontrolle für die Transformation in *A. woodii*) war erfolgreich. In den entsprechenden Hungate-Röhrchen konnte Trübung und damit Wachstum nach der Transformation festgestellt werden.

6 Diskussion

Das grün fluoreszierende Protein GFP und andere fluoreszierende Proteine sind nützliche Werkzeuge um die Expression von Genen nachvollziehen zu können. Durch die Stärke der gemessenen Fluoreszenz des Proteins kann eine Aussage über den verwendeten Promotor gemacht werden. In einer Vielzahl von Organismen erfolgt diese Überprüfung problemlos, jedoch benötigen diese Reporter Sauerstoff, weshalb deren Anwendung in strikt anaeroben Organismen bisher schwierig war. In dieser Arbeit wurden mit dem kodonoptimierten Reportergen *mCherryOpt* gearbeitet. Dieses wurde schon in dem anaeroben Bakterium *Clostridium difficile* verwendet und lieferte dort gute Resultate (Ransom *et al.*, 2014). Da es sich bei *Acetobacterium woodii* ebenfalls um ein anaerobes Bakterium mit niedrigem GC-Gehalt handelt, besteht die Möglichkeit, dass das Reportersystem mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry ebenfalls in *A. woodii* funktionieren könnte.

Aufgrund dieses Reportersystems besteht die Möglichkeit, dass durch dieses auch die Überprüfung der Aktivität verschiedener Promotoren in dem acetogenen Bakterium *A. woodii* erfolgen kann. Diese Promotorstrukturen wurden jedoch erst in *Escherichia coli* DH5α auf deren Funktionalität mit dem Reportergen *mCherryOpt* beobachtet.

6.1 Klonierung des Promotors P_{bgaL2} aus *C. perfringens*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Promotor P_{bgaL2} kloniert. Der Laktose-induzierbare Promotor P_{bgaL} stammt aus dem anaerob wachsenden Bakterium *Clostridium perfringens* und wurde erneut kloniert, wobei die neue Version, der P_{bgaL2} -Promotor 92 Bp länger ist, als der bisher verwendete P_{bgaL} -Promotor. Prinzipiell handelt es sich um die gleiche Sequenz. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 6 zu finden. Die Klonierung wurde durchgeführt, da die Möglichkeit bestand, durch die Abwandlung der Sequenz die Funktionalität des Promotors zu erhöhen und somit eine stärker regulierte Genexpression zu erhalten.

Zu Beginn wurde der Promotor P_{bgaL2} aus dem Plasmid pKOD-mazF amplifiziert. Die PCR wurde mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Primern „FW_PbgaL_NheI“ und „RV_PbgaL2_SacI“ und der KAPA-Hifi-Polymerase durchgeführt. Dieses Enzym besitzt zwei wichtige Eigenschaften für die Klonierung mithilfe des „CloneJET™ PCR“-Kit. Zum einen weist es eine *proof-reading*-Funktion auf. Auf diese Weise können Mutationen in den neu replizierten DNA-Fragmenten, welche das Insert darstellen, vermieden werden. Des Weiteren produziert die KAPA-Hifi-Polymerase nur *blunt ends*, auch „glatte Enden“ genannt. Diese sind insofern wichtig, da der verwendete Vektor auch *blunt ends* besitzt, wodurch die

Ligation mit jedem gewünschten Insert durchgeführt werden kann. Das Gegenteil der glatten Enden, die *sticky ends*, würden eine genaue Übereinstimmung der beiden Enden des Rückgrats und des Inserts erfordern und somit einen größeren Aufwand der Ligation mit sich bringen.

Der PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht. Da es sich bei dem Insert um ein 1508 Bp großes DNA-Fragment handelt, wurde die Bande, welche sich auf einer Höhe von ca. 1500 Bp befand, ausgeschnitten und gereinigt.

Nach der Vervielfältigung des Promotors wurde dieser in den Klonierungsvektor pJET1.2 ligiert und in kaltkompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Dieser Transformationsansatz wurde auf einem Ampicillin-Selektivmedium ausplattiert. Aufgrund des letalen Gens, welches durch die gezielte Einbringung des Inserts unterbrochen wird, und die auf dem Vektor pJET1.2 kodierte Ampicillin-Resistenz, kann davon ausgegangen werden, dass nur Bakterien, welche ein rekombinantes Plasmid enthalten, auf dem Selektivmedium wachsen können. Insgesamt sind fünf Kolonien auf den Ampicillin-Agaroseplatten gewachsen. Um diese zu überprüfen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt und das Ergebnis mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Das dazu gehörige Bild ist in Abbildung 2 zu sehen. In der Spur 1 ist auf der Höhe von ca. 1500 Bp eine Bande zu erkennen. Das DNA-Fragment des *P_{bgal2}*-Promotors besitzt eine Größe von 1508 Bp. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Einbringung des Inserts in den Klonierungsvektor bei diesem Klon erfolgreich war.

Um den Promotor in das Plasmid pDSW1728 einzubringen, mussten sowohl dieser, als auch der Klonierungsvektor, welcher inzwischen das Insert enthielt, einem präparativen Verdau unterzogen werden. Die hierbei verwendeten Restriktionsenzyme *NheI* und *SacI* sind in Tabelle 2 aufgeführt. Unter Abbildung 3 ist das Ergebnis der Verdau zu finden, welcher mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert wurde. In Spur 1 ist das Plasmid pDSW1728, welches als Rückgrat verwendet werden soll, zu sehen. Die Bande der Probe befindet sich in etwa auf der Höhe von 7000 Bp und stimmt somit mit der errechneten Größe von 7065 Bp überein. In der zweiten Spur wurde das pJET-Plasmid, welches das DNA-Fragment des Promotors impliziert, aufgetragen. Hierbei sind deutlich zwei Banden zu erkennen. Die des Klonierungsvektors befindet sich mit genau 3000 Bp auch auf eben dieser Höhe. Die zweite Bande befindet sich darunter, auf einer ungefähren Höhe von 1500 Bp. Hierbei handelt es sich um das DNA-Fragment des *P_{bgal2}*-Promotors, welches einer Größe von 1508 Bp entspricht.

Im folgenden Schritt wurden die eben mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI* geschnittenen Plasmide ligiert. Zwölf der gewachsenen Klone wurden mithilfe einer Kolonie-

PCR auf das rekombinante Plasmid pDSW1728_*P_{bgal2}* kontrolliert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und über Fluoreszenz sichtbar gemacht. Das dazugehörige Gelbild ist unter Abbildung 4 zu finden. Die Klone 3, 4, 9 und 11 weisen, ebenso wie die Positivkontrolle, eine Bande in Höhe von 1500 Bp auf. Hierbei handelt es sich um das erfolgreich eingebrachte Insert. Da die Bande bei Klon 3 deutlich schwächer ausfällt, wurde nur mit den Klonen 4, 9 und 11 weitergearbeitet. Diese wurden mithilfe eines Kontrollverdau zusätzlich überprüft. Der Verdau wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI* durchgeführt und ist in Abbildung 5 zu sehen, nachdem er gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht wurde. Das Bild zeigt deutlich, dass bei allen Klonen, sowie die Positivkontrolle pDSW1728_*P_{bgal}*, der Kontrollverdau geglückt ist. Bei der oberen Bande handelt es sich bei allen Proben um das linearisierte Rückgrat pDSW1728. Die zweite Bande zeigt das Insert, wobei sich die entsprechende Bande bei dem Kontrollplasmid geringfügig unter der Bande befindet, die bei den Klonen zu sehen ist. Die Differenz zwischen den DNA-Fragmenten der beiden Promotoren *P_{bgal}* und *P_{bgal2}* beträgt 92 Bp. Aufgrund der eher schwächeren Erscheinung von Klon 9 wurden nur die Klone 4 und 11 zur Sequenzierung geschickt. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Klone das erfolgreich klonierte Plasmid enthalten.

6.2 Bestimmung der Aktivität verschiedener Promotoren in *E. coli*

Diese Arbeit befasste sich hauptsächlich mit der Prüfung der Stärke und Funktionalität verschiedener Promotoren. Dabei wurde das Reportergen *mCherryOpt* zu Hilfe genommen. Es kodiert für ein rot fluoreszierendes Protein und wurde für anaerob wachsende Bakterien optimiert. (Ransom *et al.*, 2014). Bevor die Plasmide, die die verschiedenen Promotoren tragen, in dem acetogenen Bakterium *A. woodii* geprüft wurden, wurden diese in den aerob wachsenden Mikroorganismus *E. coli* DH5 α transformiert und gemessen. Die Fluoreszenz-Messungen wurden mit dem TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd., Schweiz, durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zuvor mit 0,8 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und in eine 96-Well-Microtiter-Platte gegeben. Aufgrund der roten Fluoreszenz des mCherry-Proteins wurde nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 580 – 630 nm die höchste Emission im roten Spektrum bei einer Wellenlänge von 610 nm erzielt. Die im TECAN-Reader gemessenen Werte wurden in Bezug auf die OD₆₀₀ der jeweiligen Probe betrachtet. Daraus ergab sich die relative Fluoreszenz des jeweiligen Promotors.

Zur Feststellung der Effizienz verschiedener Promotoren, wurden die jeweiligen Plasmide, welche die Promotoren enthalten, in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Sowohl die

verwendeten Plasmide, als auch die enthaltenen Promotoren sind in Tabelle 13 zu finden. Des Weiteren wurde in dieser Tabelle ggf. der Induktor mit den entsprechenden Induktormengen aufgeführt.

Als konstitutive Promotoren wurden die Promotoren P_{thlA} , $P_{pta-ackL}$, $P_{pta-ackS1}$, $P_{pta-ackS2}$ und P_{ptb} verwendet. Die beiden Promotoren P_{thlA} und P_{ptb} stammen aus dem Bakterium *Clostridium acetobutylicum*. Bei den anderen drei, aus dem anaerob wachsenden, acetogenen Bakterium *Clostridium ljungdahlii* stammenden Promotoren $P_{pta-ackL}$, $P_{pta-ackS1}$, $P_{pta-ackS2}$ handelt es sich prinzipiell um denselben Promotorbereich, welcher jedoch in seiner Länge variiert wurde.

Die in *E. coli* DH5a gemessenen Promotoren. Bei dem Promotor $P_{pta-ackL}$ handelt es sich um die vollständige Sequenz des bereits experimentell bestimmten Promotors (Öztürk, 2013). Die Promotoren $P_{pta-ackS1}$ und $P_{pta-ackS2}$ stellen jeweils eine gekürzte Version dar, in die der Originalpromotorbereich $P_{pta-ackL}$ unterteilt wurde. Dies ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Alle Versionen enthalten den experimentell bestimmten Transkriptionsstart TK (Öztürk, 2013).

Die Promotoren P_{tet} , P_{bgaL} und P_{bgaL2} zählen zu den induzierbaren Promotoren. Bei dem Tet-System des P_{tet} -Promotors (Geissendörfer & Hillen, 1990) handelt es sich um das System aus der erworbenen Resistenz gegen das Breitbandantibiotikum Tetracyclin (Saenger *et al.*, 2000). Hinter dem Mechanismus stecken die zwei divergent liegenden Gene *tetR* und *tetA*. In der Abwesenheit des Antibiotikums bilden das Repressorprotein TetR und die Tet-Operatoren einen Komplex. Der *tet*-Repressor ist aktiv und blockiert auf diese Weise die Transkription des *tetA*-Gens, welches sich stromabwärts befindet. In Anwesenheit des Tetracyclins geht dieses eine Bindung mit zweiwertigen Metallkationen ein. Diese Verbindung bindet wiederum an den Komplex des Repressorproteins TetR von den Tet-Operatoren. Auf diese Weise wird eine Veränderung der 3D-Struktur des TetR-Proteins begünstigt, was die Trennung des Repressorproteins TetR und den Tet-Operatoren zur Folge hat. Das Dissoziieren von TetR ermöglicht die Expression von *tetA*, welches für einen membrangebundenen Antiporter kodiert. Somit ist das Bakterium in der Lage das letal wirkende Tetracyclin wieder aus der Zelle zu transportieren (Berens & Hillen, 2003).

In dieser Arbeit wurde statt des Breitbandantibiotikums Tetracyclin Anhydrotetracyclin als Induktor verwendet. Dieses wirkt, im Gegensatz zu dem natürlichen Induktor des P_{tet} -Promotors, schon bei einer geringeren Konzentration und geht eine festere Bindung mit dem *tet*-Repressor ein (Degenkolb *et al.*, 1991). Des Weiteren hat es keine antibiotische Wirkung (Oliva *et al.*, 1992). Die Induktormengen des Promotors P_{tet} betrugen 0 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml Anhydrotetracyclin.

Bei den beiden Promotoren P_{bgaL} und P_{bgaL2} handelt es sich prinzipiell um denselben, aus dem anaerob wachsenden Bakterium *Clostridium perfringens* stammenden Promotorbereich. Der Promotor P_{bgaL2} , welcher in dieser Arbeit kloniert wurde, besteht aus der Erweiterung Sequenz des Promotors P_{bgaL} um 92 Bp stromabwärts. Durch die Veränderung in der Länge des Promotors bestand die Möglichkeit eine stärkere Promotoraktivität zu erzielen. Eine schematische Darstellung der beiden Promotoren P_{bgaL} und P_{bgaL2} ist in Abbildung 6 zu finden. Die Promotoren P_{bgaL} und P_{bgaL2} wurden mit Laktose induziert. Die Induktormengen betrugen dabei 0 mM, 1 mM, 10 mM und 20 mM des Induktors. Für eine genauere Datenerhebung wurde der in dieser Arbeit klonierte Promotor P_{bgaL2} wurde zusätzlich mit 5 mM Laktose induziert.

Das Plasmid pDSW1728_C1 enthält keinen Promotor und fungiert als Negativkontrolle. Um ausschließen zu können, dass das Ergebnis nicht durch eine Fluoreszenz unabhängig der geprüften Promotoren verfälscht wird, wurden diese Proben mit den höchsten eingesetzten Induktormengen induziert. Zum einen mit 400 ng/ml Anhydrotetracyclin und zum anderen mit 20 mM Laktose.

Es wurde mit der Negativkontrolle, dem Plasmid pDSW1728_C1 begonnen. Obwohl es sich um ein nicht-induzierbares System handelt, wurden die *E. coli* DH5 α -Zellen, welche das Plasmid pDSW1728_C1 enthielten, mit den höchsten Induktormengen der jeweiligen Substanz versetzt. Durch die Induktion mit Anhydrotetracyclin und Laktose, welche zu zwei unterschiedlichen Proben hinzugegeben wurden, konnte sichergestellt werden, dass das Plasmid pDSW1728 ohne Promotor, welches als Rückgrat fungiert, in keinem Fall eine eigene Promotoraktivität besitzt und ohne eine der klonierten Promotorstrukturen das Reportergen nicht abgelesen werden kann. In Abbildung 8 ist gut zu erkennen, dass die Werte der relativen Fluoreszenz, welche für den Stamm mit dem Plasmid pDSW1728_C1-Plasmids gemessen wurden, sowohl bei einer Induktion mit Laktose, als auch mit Anhydrotetracyclin bei Null liegen. Im gleichen Diagramm sind außerdem die Werte für die Promotoren P_{thlA} und P_{ptb} aufgeführt. Bei Ersterem handelt es sich um den mit Abstand stärksten Promotor, welcher in dieser Arbeit gemessen wurde.

In Abbildung 9 sind die Werte für die drei Versionen des $P_{pta-ack}$ -Promotors aufgeführt. Hierbei ist gut zu erkennen, dass der Promotor $P_{pta-ackS1}$ zwar eine Aktivität aufweist, diese jedoch deutlich unter der Aktivität des 43 Bp-kürzeren Promotor $P_{pta-ackS2}$ liegt. Wie in der schematischen Darstellung in Abbildung 7 zu sehen ist, befinden sich die -10-Box und die -

-35-Box auf der Sequenz des Promotors $P_{pta-ackS1}$. Bei diesen beiden Promotor-Elementen handelt es sich um DNA-Sequenzen, welche nach einer bestimmten Konsensussequenz aufgebaut sind und auf den Transkriptionsstart verweisen. Außerdem ermöglicht sie das Andocken der RNA-Polymerase. Im Gegensatz zu $P_{pta-ackS1}$ wurden diese Elemente bisher bei der Sequenz von $P_{pta-ackS2}$ noch nicht experimentell belegt. Somit wird die Vermutung unterstützt, dass die Sequenz des Promotors $P_{pta-ackS2}$ ebenfalls eine -10-Box und eine -35-Box besitzt. Addiert man die Werte der relativen Fluoreszenz, die für die beiden Promotoren $P_{pta-ackS1}$ und $P_{pta-ackS2}$ erhalten wurden, wird nicht einmal die Hälfte des Werte des Promotors $P_{pta-ackL}$ erreicht. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass sich die Aktivität der längeren Form des $P_{pta-ack}$ -Promotors nicht durch die Aktivitäten der beiden kürzeren Versionen zusammensetzt, sondern die Effizienz des Promotors $P_{pta-ackL}$ in seiner Sequenz liegt. Wahrscheinlich ermöglicht die lange Version der Sequenz, wie es bei dem Promotor $P_{pta-ackL}$ der Fall ist, die Bindung von einem oder mehreren Aktivatoren. Dadurch könnte die Genexpression des Reportergens *mCherryOpt* gesteigert werden, was sich auf die Werte der relativen Fluoreszenz des Promotors $P_{pta-ackL}$ auswirkt. Folglich verfügt der Promotor $P_{pta-ackL}$ über eine höhere Effizienz als die beiden kürzeren Formen, die Promotoren $P_{pta-ackS1}$ und $P_{pta-ackS2}$.

Bei den induzierbaren Promotoren wurde der Promotor P_{tet} mit unterschiedlichen Mengen des Induktors Anhydrotetracyclin induziert und anschließend die Aktivität des Promotors über die Messung der Fluoreszenz im Zusammenhang mit der OD_{600} der Probe bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Der Wert der relativen Fluoreszenz des nicht-induzieren Promotors ist der Niedrigste. Des Weiteren ist eine Steigung der Werte proportional zur Induktormenge zu erkennen. Ähnliches ist in der Veröffentlichung von Skerra (1994) über die Steigerung der Promotoraktivität des P_{tet} -Promotors durch die Induktion von Anhydrotetracyclin beschrieben worden.

Durch das Fehlen des Anhydrotetracyclin wird die Aktivität des Promotors P_{tet} gehemmt. Bei der Zugabe des Induktors wird der *tet*-Repressor inaktiviert, wodurch der Promotor für die Bindung der RNA-Polymerase frei und das Ablesen des Reportergens ermöglicht wird (Berens & Hillen, 2003). Auf diese Weise wird die Synthese des rot fluoreszierenden Reporterproteins möglich, was die Messungen des TECAN-Readers zeigen.

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der beiden Promotoren P_{bgaL} und P_{bgaL2} betrachtet. Das Diagramm mit den Messungen des P_{bgaL} -Promotors sind in Abbildung 11 zu sehen. Das des P_{bgaL2} -Promotors in Abbildung 12.

Bei den Ergebnissen des P_{bgaL} -Promotors ist auffällig, dass der gemessene Wert der relativen Fluoreszenz für den nicht-induzierten Promotor sich kaum von dem Wert unterscheidet, welcher mit der höchsten eingesetzten Induktormenge erhalten wurde. Betrachtet man im Vergleich die Werte des nicht-induzierten P_{bgaL2} -Promotors in Abbildung 12, ist auch hier eine hohe Aktivität trotz Fehlen des Induktors festzustellen. Des Weiteren weisen die Werte beider Promotoren keine stetige Steigerung auf. In dem Diagramm des P_{bgaL} -Promotors wurde der höchste Wert der relativen Fluoreszenz bei einer Induktormenge von 1 mM Laktose gemessen. Das Diagramm des P_{bgaL2} -Promotors weist bei einer Induktormenge von 10 mM Laktose einen deutlich niedrigeren Wert auf, als bei den Induktormengen von 5 mM und 20 mM Laktose. Dieses „Einknicken“ der Werte deutet vermutlich auf eine fehlerhafte Messung hin.

Von Hartman *et al.* (2011) wurden andere Ergebnisse beschrieben. Es wurde der Promotor P_{bgaL2} verwendet, welcher nicht induziert kaum Aktivität aufweist. Beim Erhöhen der Induktormenge des Induktors Laktose ist eine Erhöhung der Genexpression zu erkennen. Diese weist auf die zunehmende Stärke des P_{bgaL2} -Promotors hin.

Nach der genauen Betrachtung der einzelnen Promotoren, wurden nun die Werte der relativen Fluoreszenz aller Promotoren normiert und in einem gemeinsamen Diagramm dargestellt. Dieses ist in Abbildung 13 zu finden. Die relative Fluoreszenz wird nun in Prozent angegeben. Der höchste Wert des Versuchs wurde 1 gesetzt, was 100 % entspricht. Es handelt sich dabei um die Werte der relativen Fluoreszenz, die mit dem P_{thlA} -Promotor erzielt wurden. Die Negativkontrollen entsprachen 0 %. Die Werte der anderen Promotoren wurden dementsprechend normiert und in dem Diagramm aufgeführt. Durch diese Darstellung wird deutlich, dass der P_{thlA} -Promotor mit Abstand der stärkste Promotor ist. Die Promotoren $P_{pta-ackL}$ und P_{ptb} verfügen über eine ähnliche Stärke, sind aber bereits ca. 75 % schwächer als der Promotor P_{thlA} . Die Aktivität aller anderen Promotoren liegt unter 15 % im Vergleich zum P_{thlA} -Promotor.

Diese Darstellung zeigt eine Übersicht aller verwendeten Promotoren und ermöglicht einen Vergleich der Stärke dieser Promotoren. Insbesondere bei zukünftigen Versuchen wird die Wahl des Promotors auf diese Weise erleichtert. Je nach gewünschter Stärker der Genexpression in *E. coli* kann zwischen den aufgeführten Promotoren gewählt werden. Des

Weiterem kann zwischen einem konstitutiven oder induzierbaren Promotor entschieden werden.

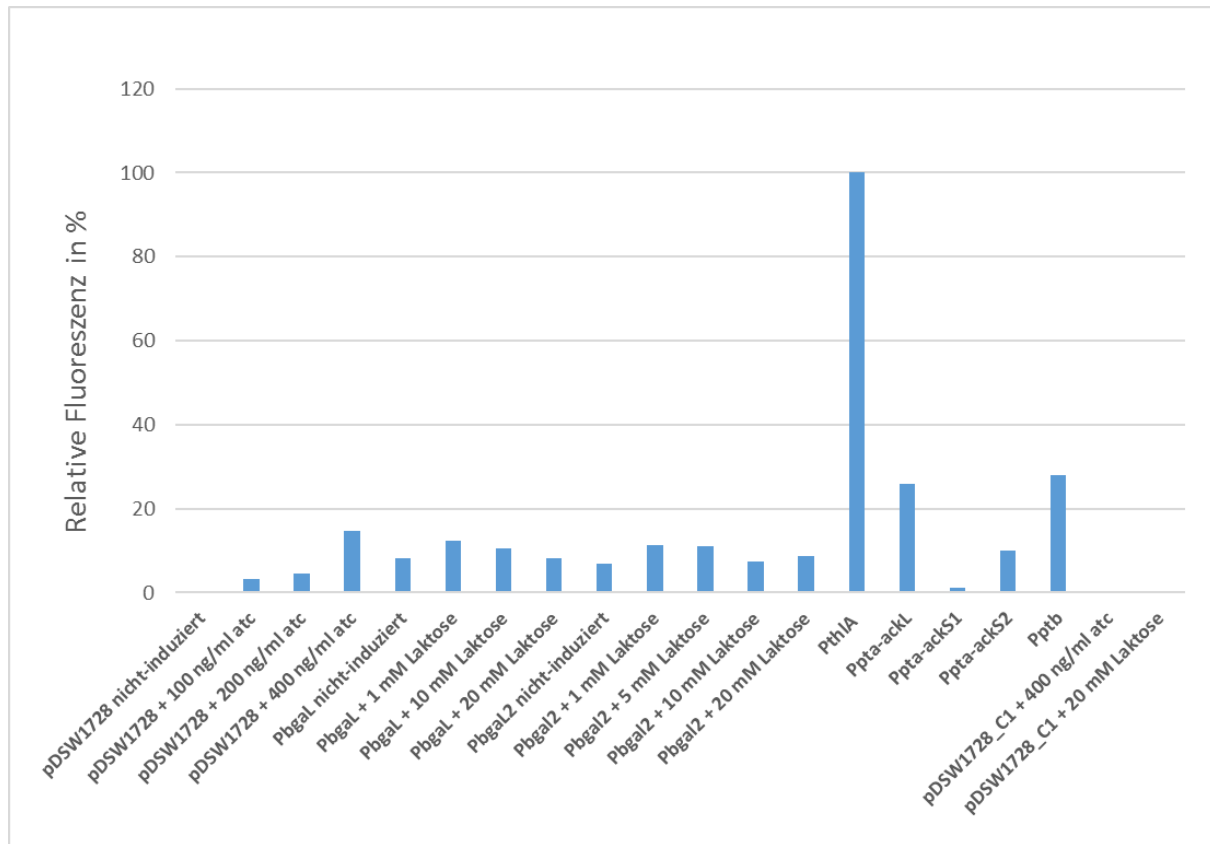


Abbildung 13 Vergleich der normierten Werte alle Promotoren, ggf. mit unterschiedlichen Induktormengen.

Neben der relativen Fluoreszenz, die mithilfe des TECAN-Reader gemessen und in den in dieser Arbeit dargestellten Diagrammen aufgeführt wurde, konnte schon während des Versuchs eine Beobachtung gemacht werden, die auf die Stärke der konstitutiven Promotoren P_{thlA} , P_{ptb} und $P_{pta-ackL}$ hinwies. Abbildung 14 zeigt vier Reaktionsgefäßen, welche die Pellets von jeweils 4 ml *E. coli*-Zellkultur enthalten. Die *E. coli*-DH5 α -Zellen trugen die Plasmide pDSW1728_ P_{thlA} , pDSW1728_ $P_{pta-ackL}$, pDSW1728_ P_{ptb} oder pDSW1728_C1. Das Zellpellet, welches *E. coli*-DH5 α - mit dem pDSW1728_ P_{thlA} -Plasmid enthält, weist eine auffällige Rotfärbung auf. Das deutet auf die hohe Aktivität des in dem pDSW1728_ P_{thlA} -Plasmid enthaltenen P_{thlA} -Promotor hin. Die Pelletfärbungen der Zellen, welche die Plasmide pDSW1728_ $P_{pta-ackL}$ und pDSW1728_ P_{ptb} enthalten, unterscheiden sich farblich kaum. Wie in dem Diagramm, welche in Abbildung 13 dargestellt ist, gezeigt wird, zeigen die Promotoren $P_{pta-ackL}$ und P_{ptb} ähnliche Stärken, was sich in der Färbung der jeweiligen Zellen widerspiegelt. Das letzte Pellet besteht aus *E. coli* DH5 α -Zellen, welche das Plasmid pDSW1728_C1 enthalten. Es ist keine Rotfärbung zu erkennen. Durch die Fluoreszenz-Messungen mit dem TECAN-Reader ist bekannt, dass bei diesen Zellen kein rotes Licht

emittiert wurde. Diese Ergebnisse des Plasmid pDSW1728_C1, welches als Negativkontrolle fungierte, sind in Abbildung 8 zu finden.

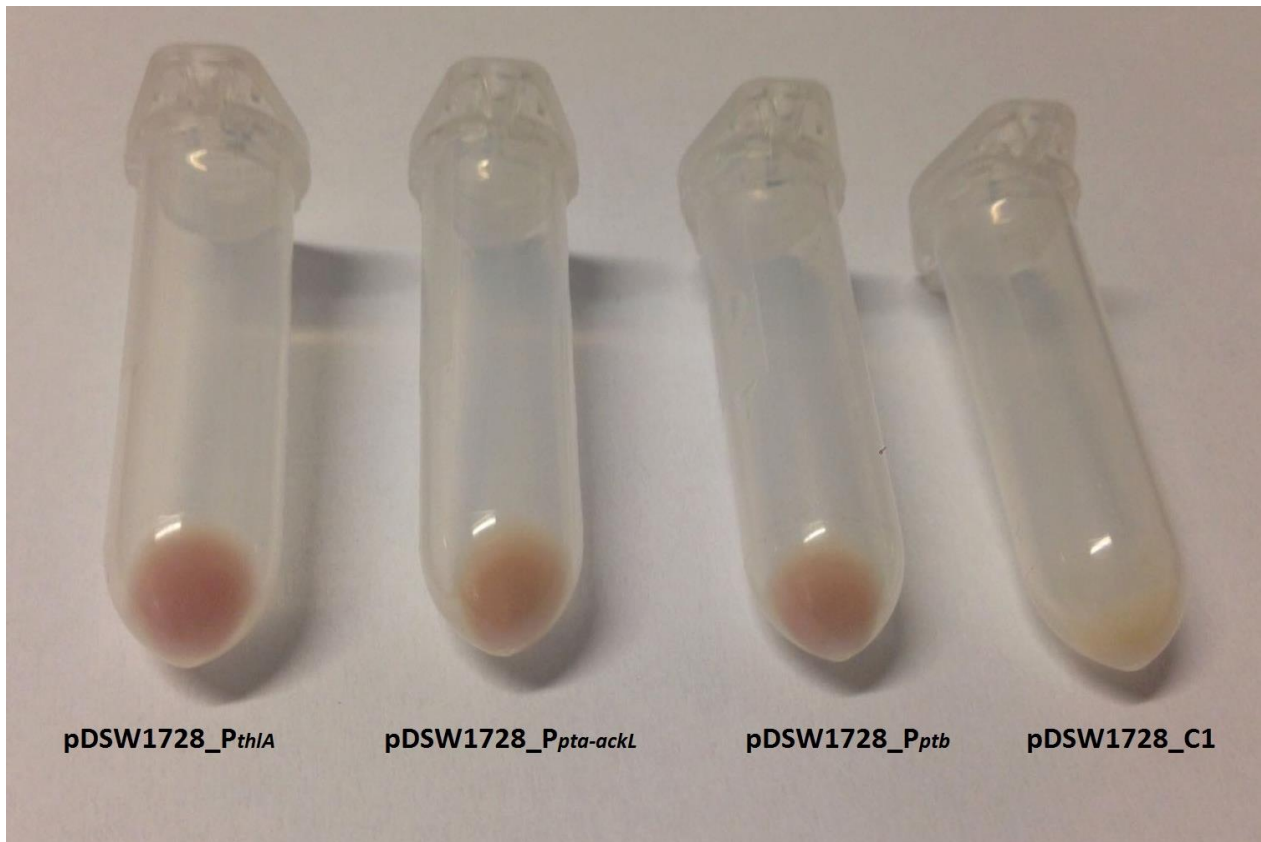


Abbildung 14 Pellets von je 4 ml *E. coli* DH5 α -Zellkultur. Die *E. coli*-Zellen enthalten folgende Plasmide (von links nach rechts): pDSW1728_P $_{thlA}$, pDSW1728_P $_{pta-ackL}$, pDSW1728_P $_{ptb}$ und pDSW1728_C1.

6.3 Transformation verschiedener Plasmide in *Acetobacterium woodii*

In dem acetogenen Bakterium *A. woodii* konnte aufgrund des bisher fehlenden Reportersystems noch keine Aussage über die Stärke von Promotoren gemacht werden. Dies spielt sowohl bei der Klonierung, als auch bei der Expression von Genen eine wichtige Rolle. Des Weiteren gibt es in *A. woodii* noch kein induzierbares System. Hierbei handelt es sich um ein wichtiges Werkzeug zur Regulierung der Genexpression.

Das Reportergen *mCherryOpt*, welches für ein rot fluoreszierendes Reporterprotein kodiert und auf diese Weise einen Rückschluss auf die Genexpression liefert, ermöglicht auch in anaerob wachsenden Organismen die Überprüfung der Effizienz des jeweiligen Promotors.

In *Clostridium difficile*, einem ebenfalls anaeroben Mikroorganismus, gelang die Verwendung des induzierbaren Promotors P $_{tet}$ (Geissendörfer & Hillen, 1990), welcher in dem Plasmid pDSW1728 enthalten ist. Um die Aktivität des P $_{tet}$ -Promotors bei unterschiedlichen Induktormengen des Induktors Anhydrotetracyclin nachvollziehen zu können, wurde das Reportergen *mCherryOpt* verwendet. (Ransom *et al.*, 2014).

Um sowohl die induzierbaren Promotoren P_{tet} , P_{bgaL} und P_{bgaL2} , als auch die konstitutiven Promotoren P_{thlA} , $P_{pta-ackL}$, $P_{pta-ackS1}$, $P_{pta-ackS2}$ und P_{ptb} in *A. woodii* zu testen, wurde versucht Plasmide, welche die eben genannten Promotoren enthalten, in das acetogene Bakterium zu transformieren. Diese sind in Tabelle 13 aufgeführt. Dabei konnte nur bei der Positivkontrolle, dem Plasmid pJIR750, ein Wachstum beobachtet werden. Aus diesem Grund können sowohl die verwendeten Zellen, als auch die Wachstumsbedingungen als Fehlerquellen für das fehlende Wachstum der *A. woodii*-Zellen ausgeschlossen werden. Eventuell wurden die restlichen Plasmide bei der Elektroporation nicht in das Bakterium aufgenommen, wodurch kein Wachstum in dem Thiamphenicol-Selektivmedium möglich war.

In dem von Hoffmeister *et al.* (2016) veröffentlichten Artikel wurde für die beiden Promotoren P_{thlA} und $P_{pta-ackL}$ die größte Aktivität in dem acetogenen Bakterium *A. woodii* festgestellt, da bei den beiden Promotoren die höchsten Acetonmengen gemessen wurde. Sollte das Reporterprotein mCherry in *A. woodii* funktional sein, kann die Stärke dieser beiden Promotoren unter Verwendung des in dieser Arbeit beschriebenen Systems bestimmt werden.

7 Ausblick

Am Ende dieser Arbeit kann zusammengefasst gesagt werden, dass das Reportergen *mCherryOpt*, welches schon erfolgreich in dem anaeroben Bakterium *Clostridium difficile* verwendet wurde (Ransom *et al.*, 2014), auch für das aerobe Bakterium *Escherichia coli* verwendet werden kann. Die Durchführung der Experimente am TECAN-Reader „Infinite® 200 PRO“ der Tecan Group Ltd., Schweiz, waren erfolgreich und haben Aufschluss über die Stärke der verwendeten Promotoren gegeben. Insbesondere der P_{thlA} -Promotor ist mit seiner hohen Aktivität sehr aufgefallen. Nach dem Vergleich der Werte der relativen Fluoreszenz der Promotoren P_{bgaL} und P_{bgaL2} , welche sich aus der gemessenen Emission in Bezug auf die vorhandene OD₆₀₀ ergab, konnte festgestellt werden, dass das neu klonierte Plasmid pDSW1728_ P_{bgaL2} , welches den Promotor P_{bgaL2} enthält, keine höhere Stärke in *E. coli* besitzt als der 92 Bp kürzere P_{bgaL2} -Promotor.

Über die Effektivität der Promotoren in dem acetogenen Bakterium *Acetobacterium woodii* kann keine Aussage gemacht werden, da nach zweimaliger Transformation aller in Tabelle 13 aufgeführten Plasmide in *A. woodii* kein Wachstum zu erkennen war. In der Veröffentlichung von Ransom *et al.* (2014) wurde die Verwendung des Reportergens *mCherryOpt* in *C. difficile* als sehr effektiv beschrieben. Da es sich bei *C. difficile*, ebenso wie bei *A. woodii*, um ein anaerobes Bakterium mit niedrigem GC-Gehalt handelt, wurde das Reporterprotein mCherry auch für *A. woodii* in Betracht gezogen.

Voraussetzung hierfür ist unter anderem das Gelingen der Transformation der entsprechenden Plasmide in das acetogene Bakterium.

Literaturverzeichnis

Adamse, A. D. (1980). New isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa). *Antonie van Leeuwenhoek* 46:523-531.

Bannam, T. L. & J. I. Rood (1993). *Clostridium perfringens* - *Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid* 29:233-235.

Bengelsdorf, F. R., Straub M. & P. Dürre (2013). Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environmental Technology* 34:1639-1651.

Berens, C. & W. Hillen (2003). Gene regulation by tetracyclines. *FEBS Journal* 270:3109-3121.

Braun, M., Mayer, F. & G. Gottschalk (1981). *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Archives of Microbiology* 128:288-293.

Brock, T.; Madigan, M.; Martinko, J. & J. Parker. (1970): *Biology of Microorganisms*. 7. Auflage: Prentice-Hall International, Inc.: S. 155-174

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward W. W. & D. C. Prasher. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.

Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad G. A. & W. Hillen (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35:1591-1595.

Drake, H. L., Gößner, A. S. & S. L. Daniel. (2008). Old acetogens, new light. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125:100-128.

Fischer, F., Lieske, R. & K. Winzler (1932). Biologische Gasreaktionen. II. Über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure zu Methan. *Biochemistry* 245:2-12.

Geissendörfer, M. & W. Hillen (1990). Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded *tet* regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33:657-663.

Green, M. R. & J. Sambrook. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Hartman, A. H., Lui, H. & S. B. Melville (2011). Construction and characterization of a lactose-inducible promoter system for controlled gene expression in *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:471-478.

Hoffmeister, S., Gerdorf, M., Bengelsdorf, F. R., Linder, S., Flüchter, S., Öztürk, H., Blümke, W., May, A., Fischer, R., Bahl, H. & P. Dürre (2016). Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*. *Metabolic Engineering*. 36:37-47.

Oliva, B., Gordon, G., McNicholas, P., Ellestad G. & I. Chopra (1992). Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:913-919.

Öztürk, Hatice (2013) *Etablierung eines induzierbaren Systems in Clostridien*. 140, Ulm, Universität Ulm, Fakultät für Naturwissenschaften, Doktorarbeit

Ragsdale, S. W. (2008). Enzymology of the wood-ljungdahl pathway of acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125:129-136.

Ransom, E. M., Ellermeier, C. D. & D. S. Weiss (2014). Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology* 81:1652-1660.

Saenger, W., Orth, P., Kisker, C., Hillen, W. & W. Hinrichs (2000). Der Tetracyclin-Repressor – das Musterbeispiel für einen biologischen Schalter. *Angewandte Chemie* 112:2122-2133.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich. (1988). *Primer*-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich & N. Arnheim. (1985). Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

Sambrook, J., D. W. Russell, N. Irwin & K. A. Janssen. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:5463-5467.

Schiel-Bengelsdorf, B. & P. Dürre (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters* 586:2191-2198.

Shimomura O., Johnson F. H. & Y. Saiga (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59:223-39.

Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151:131-135.

Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67:509-44.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 4. Juli 2016

Anna Grun